

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**Análise e otimização da tecnologia de transdução ótica por  
ressonância de plasmão de superfície na determinação da  
concentração de Proteína C Reativa (PCR)**

Cátia Patrícia da Silva Marques Alves

**Mestrado em Biologia Molecular e Genética**

Dissertação orientada por:  
Professora Doutora Rita Zilhão  
Professora Doutora Susana Gomes



## Índice

Resumo.....	v
Abstract .....	vii
Agradecimentos.....	viii
Índice de figuras .....	viii
Índice de tabelas.....	x
Lista de acrónimos .....	xi
Lista de símbolos.....	xii
1 – Introdução .....	1
1.1 – Testes junto do paciente ( <i>Point-of-care-testing</i> ).....	1
1.2 - Ressonância de plasmão de superfície (SPR) .....	2
1.2.1 – Acoplamento por <i>grating</i> .....	2
1.2.2 - Métodos de quantificação .....	3
1.2.3 – Construção de uma superfície de reconhecimento biológico ( <i>BRL-Biological Recognition Layer</i> ).....	4
1.3 - Teoria da dinâmica molecular.....	6
1.3.1 - Cinética molecular .....	6
1.3.2 - Transporte de massa.....	7
1.4 - Nanopartículas de ouro .....	8
1.5 - Proteína C reativa.....	9
1.6 – Objetivos .....	9
2 - Materiais e Métodos.....	10
2.1 – Equipamento e disco .....	10
2.2 – Reagentes e material biológico .....	12
2.2.1 – Conjugação de nanopartículas ouro .....	12
2.3 – Validação analítica .....	13
2.3.1 - Aprovação de um lote de produção.....	13
3 – Resultados e discussão .....	14
4 - Conclusões e perspetivas futuras.....	25
5 – Referências bibliográficas.....	26



## Resumo

A tecnologia de *point-of-care* surgiu de forma a permitir o diagnóstico rápido e eficaz, tornando possível uma intervenção e tratamento atempados por parte do profissional de saúde. A Biosurfit S.A. é uma empresa portuguesa que desenvolve e produz dispositivos médicos que permitem a realização de diversos testes quantitativos perto do paciente. Além da máquina onde se processa a leitura de dados, o spinit®, existe um conjunto de discos multi-paramétricos descartáveis que, mediante a utilização de uma única gota de sangue e sem necessidade de reagentes adicionais por parte do utilizador, fornecem resultados quantitativos num período inferior a 15 minutos. Um dos testes desenvolvidos foi a análise da proteína C reativa, cujo disco possui várias zonas de deteção que incluem a camada de reconhecimento biológico, que contém fragmentos de anticorpos imobilizados numa superfície de ouro. Quando o plasma do paciente passa por estas zonas, o marcador-alvo é ligado aos fragmentos de anticorpos imobilizados. Este fenómeno induz uma alteração no índice de refração que, posteriormente, é amplificado pela ligação de nanopartículas de ouro, também estas específicas do analito. A tecnologia do leitor tem por base o fenómeno de ressonância de plasmão de superfície.

Neste contexto, esta dissertação teve como objetivo inicial a redução do tempo de teste sem alteração da gama de deteção da proteína C reativa. Ao longo do estudo verificou-se que com a dimensão das nanopartículas de ouro existentes no sistema tornava-se inexecutável o cumprimento do objetivo, pois a gama era diminuída. Tal foi possível através da utilização de nanopartículas de ouro de 20 nm que permitiram, para além da diminuição do tempo de teste (objetivo principal), aumentar a gama de deteção.

Os resultados obtidos permitiram validar analiticamente a melhoria do produto e submeter uma certificação europeia do mesmo, uma vez que a deteção da proteína C reativa foi melhorada de 5 a 100 mg/L para 4 a 180 mg/L e o tempo de ensaio encurtado de 15 para 6 minutos.

**Palavras-chave:** Tecnologia *point-of-care*, spinit, Biosurfit, ressonância de plasmão de superfície, proteína C reativa.

## **Abstract.**

Point-of-care technology emerged in order to allow a quick and efficient diagnosis, making possible a timely intervention and treatment by healthcare professionals. Biosurfit SA. is a company that developed and produced a medical equipment that allows to perform several quantitative tests near the patient. Besides the reading instrument where the data are read, the spinit®, there is a set of multi-parametric disposable disks, that through the use of a simple drop of blood and without the need of using additional reagents by the user, makes possible to provide quantitative results in less than 15 minutes. One of the developed assays was the C-reactive protein, whose disposable hold several detection zones which include a biological recognition layer, using antibody fragments immobilized on a gold surface. When the patient's blood plasma passes through this zones, the target marker binds to the immobilized antibody fragments. This phenomenon induces a change in the refractive index which subsequently is amplified through the binding with gold nanoparticles. The underlying technology of this reader is the surface plasmon resonance.

In this context, this dissertation had as initial goal the assay time reduction without changing the detection ranges for C-reactive protein. Throughout this study it was verified that with the systems' existent gold nanoparticles size it wouldn't be possible to fulfill the objective, since the detection range was diminished. This was achieved using 20 nm gold nanoparticles that allowed, beside assay time reduction (main objective), to improve the detection range.

The results obtained allowed to analytically validate the product's improvement and to submit a European Conformity marking, since the C-reactive protein detection range was improved from 5 to 100 mg/L to 4 to 180 mg/L and the assay time shortened from 15 to 6 minutes.

**Key-words:** point-of-care technology, spinit, Biosurfit, surface plasmon resonance, C-reactive protein.

## Agradecimentos

Para a realização desta tese foi imprescindível poder contar com algumas pessoas, às quais estarei eternamente grata por me ajudarem a concluir mais uma etapa da minha vida.

Quero agradecer a toda a equipa da Biosurfit, e principalmente ao Doutor João Fonseca, por ter permitido a realização desta tese.

À minha querida orientadora externa, a Doutora Susana Gomes por toda a disponibilidade, conselhos, auxílio e amizade prestada ao longo do tempo. A todos os meus colegas de trabalho, em especial ao Sandro Bordeira pela paciência que teve comigo, aos membros do R&D e da produção pelo companheirismo e amizade, e a tantos outros que fazem parte desta fantástica equipa!

À minha orientadora interna, a Professora Rita Zilhão por me ter permitido realizar esta tese e por ter estado sempre presente.

Finalizados os agradecimentos a todos aqueles que contribuíram de uma forma direta para a concretização deste projeto, seguem-se os agradecimentos a todos aqueles que foram os pilares intelectuais e emocionais no decorrer desta última fase.

Aos meus pais e irmãos, começo por pedir desculpa por ter estado muitas vezes ausente fisicamente e mentalmente. Sem o vosso apoio, carinho e compreensão nunca teria sido possível chegar onde cheguei. Foram e sempre serão o meu pilar, e prometo que nunca vos vou desiludir. O que sou hoje é em grande parte devido a vocês.

Ao meu querido Mauro Ribeiro, por toda a paciência e conselhos, por todo o amor, união e apoio demonstrado.

A toda a minha família pelas palavras de incentivo e por acreditarem em mim.

A todos aqueles que, embora não nomeados, mas não esquecidos, estiveram sempre ao meu lado com palavras de encorajamento e força.

A todos vós o meu sincero muito obrigada!

## Índice de figuras

Figura 1.1 Spinit®, equipamento da Biosurfit S.A. (à esquerda), discos descartáveis pertencentes a diversos testes clínicos (à direita). Adaptado de [6].	1
Figura 1.2 Decaimento exponencial da onda evanescente a partir da superfície da interface metálica. Adaptado de [11].	2
Figura 1.3 Configuração por <i>grating</i> utilizada no acoplamento do plasmão à superfície metálica. Superfície metálica periodicamente modelada ( $\Lambda$ ), onde $\Theta$ representa o ângulo de incidência da onda eletromagnética [11].	3
Figura 1.4 Representação gráfica de duas modulações de variação de intensidades de luz refletida. 1) Intensidade da luz refletida em função do ângulo de incidência para um comprimento de onda fixo de duas amostras diferentes. 2) Intensidade da luz refletida em função do comprimento de onda com um ângulo de incidência fixo para duas amostras diferentes. Adaptado de [7].	4
Figura 1.5 Esquema de um perfil de adsorção de uma proteína num método de SPR. A mudança no valor do ângulo de SPR em função do tempo é usada para monitorizar a cinética de adsorção, onde $I_R$ é a intensidade da radiação refletida e mDA representa miligraus de ângulo. Adaptado de [7].	4
Figura 1.6 Formas recombinantes de anticorpos. O fragmento scFv é composto por um domínio variável pesado (VH - vermelho) e leve (VL - verde), ligadas por um ligante flexível nas suas extremidades terminais. Um fragmento scAb incorpora uma cadeia constante leve adicionada ao terminal de VL. O fragmento Fab contém o VH (vermelho) e VL (verde), e uma cadeia constante pesada (azul) e uma leve (cinza) [13].	5
Figura 1.7 Estrutura terciária da proteína C reativa. Adaptado de [28].	9
Figura 2.1 A) Componentes do módulo de SPR presente no Spinit®. B) Sensograma. A – aumento de sinal devido à entrada da amostra na zona de deteção B – Aumento de sinal devido à entrada das Nps Au na zona de deteção. C – Entrada de tampão de lavagem.	10
Figura 2.2 Constituição do disco da PCR. A – <i>blister</i> com <i>buffer</i> . B – Local de colocação do sangue capilar.	11
Figura 2.3 Constituição da camada de reconhecimento biológico (BRL), e respetivas reações biológicas.	11
Figura 3.1 Comparação do tempo compreendido entre a entrada da amostra na câmara de leitura e a saída das Nps Au da mesma e sinal total da primeira zona de deteção obtido em pixel correspondente a 100 $\mu\text{g/mL}$ de PCR. Azul claro corresponde a uma rotação da amostra de 1500 rpm, azul escuro a 1700 rpm e cinza a 2300 rpm. Triângulo vermelho corresponde ao controlo (1700 rpm / 1700 rpm). Barras de erro correspondentes ao desvio padrão.	14
Figura 3.2 Relação entre o $k_m$ ( $\text{s}^{-1}$ ) das Nps Au e a taxa de adsorção (pixel/s) correspondente a 100 $\mu\text{g/mL}$ de PCR. Azul claro corresponde a uma rotação das Nps Au de 1500 rpm, azul escuro	



a 1700 rpm e cinza a 2300 rpm. Triângulo vermelho corresponde ao controlo (1700 rpm/1700 rpm). Barras de erro correspondentes ao desvio padrão.....	15
Figura 3.3 Relação entre o $k_m$ ( $s^{-1}$ ) da amostra e a taxa de adsorção (pixel/s) correspondente a 100 $\mu g/mL$ de PCR. Azul claro corresponde a uma rotação das Nps Au de 2000 rpm, azul escuro a 1700 rpm e cinza a 2300 rpm. Triângulo vermelho corresponde ao controlo (1700rpm/1700rpm). Barras de erro correspondentes ao desvio padrão.....	15
Figura 3.4 Relação entre os $k_m$ ( $s^{-1}$ ) e os sinais normalizados ao sinal controlo, para dados obtidos experimentalmente e teoricamente através da equação 1.15.....	16
Figura 3.5 Nanopartículas de ouro de 15 nm conjugadas com scAbs anti-Proteína C reativa a diferentes concentrações. 1 – Controlo negativo (0 $\mu g/mL$ ) ; 2 - 2 $\mu g/mL$ ; 3 – 2,5 $\mu g/mL$ ; 4 – 3 $\mu g/mL$ .....	16
Figura 3.6 Nanopartículas de ouro de 20 nm conjugadas com scAbs anti-Proteína C reativa a diferentes concentrações. 1 – Controlo negativo (0 $\mu g/mL$ ) ; 2 - 2 $\mu g/mL$ ; 3 – 3 $\mu g/mL$ ; 4 – 4 $\mu g/mL$ .....	17
Figura 3.7 Nanopartículas de ouro de 40 nm conjugadas com scAbs anti-Proteína C reativa a diferentes concentrações. 1 – Controlo negativo (0 $\mu g/mL$ ) ; 2 - 2 $\mu g/mL$ ; 3 – 3 $\mu g/mL$ ; 4 – 4 $\mu g/mL$ ; 5 – 5 $\mu g/mL$ ; 6 – 7 $\mu g/mL$ ; 7 – 10 $\mu g/mL$ .....	17
Figura 3.8 Relação entre a os diâmetros das Nps Au (nm) e o tempo de teste (minutos) com o sinal total obtido (pixel). Barras de erro correspondem ao desvio padrão.....	20
Figura 3.9 A) Relação entre a os diâmetros das Nps Au (nm) e o coeficiente de difusão teórico ( $m^2/s$ ). B) Relação entre o diâmetro da Nps Au e o rácio entre a adsorção e o $k_m$ teórico (pixel).....	21
Figura 3.10 Relação entre o tempo (9 e 6 minutos) e o local de conjugação das Nps Au (biosurfit e empresa externa) e o sinal total obtido (pixel) para 160 $\mu g/mL$ de PCR. Barras de erro correspondentes ao desvio padrão.....	21
Figura 3.11 Relação entre o valor de PCR e sinal da primeira zona de deteção (azul claro), média de sinal em todas as zonas de deteção (azul escuro) e sinal da ultima zona de deteção (verde). Método de referência: Siemens ADVIA 2400.....	22
Figura 3.12 Relação entre o valor de PCR no método de referência e o obtido no spinit®. Método de referência: Siemens ADVIA 2400.....	23
Figura 3.13 Linearidade do teste PCR numa gama de 2,9 a 191 mg/L. *método de referência: Siemens ADVIA 2400.....	23
Figura 3.14 Equivalência do teste spinit®-PCR com o método de referência: Siemens ADVIA 2400 numa gama de 4,1 a 183,5 mg/L.....	24

## Índice de tabelas

Tabela 1.1 Valor semiológico da proteína C reativa e o seu significado clínico. Adaptado de [32].....	9
Tabela 2.1 Reagentes e material biológico utilizado no processo de conjugação de nanopartículas de ouro.....	11
Tabela 2.2 Concentrações de scAbs em estudo para diferentes diâmetros de Nps Au.....	12
Tabela 2.3 Requerimentos da validação.....	13
Tabela 3.1 Concentrações teóricas e experimentais necessárias para cobrir toda a superfície de nanopartículas de 15, 20 e 40 nm de diâmetro.....	16
Tabela 3.2 Concentrações teóricas e experimentais necessárias para cobrir toda a superfície de nanopartículas de 15, 20 e 40 nm de diâmetro.....	17
Tabela 3.3 Impacto da variação da % (m/v) de BSA e da DO na média e desvio padrão de todas as zonas de deteção em nanopartículas de 15 nm em solução para um tempo de teste de 15 minutos.....	18
Tabela 3.4 Impacto da variação da % (m/v) de BSA e da DO na média e desvio padrão de todas as zonas de deteção em nanopartículas de 20 nm em solução para um tempo de teste de 15 minutos.....	19
Tabela 3.5 Impacto da variação da % (m/v) de BSA e da DO na média e desvio padrão de todas as zonas de deteção em nanopartículas de 40 nm em solução para um tempo de teste de 15 minutos.....	19
Tabela 3.6 Impacto da variação da % (m/v) de BSA e da DO na média e desvio padrão de todas as zonas de deteção em nanopartículas de 15 nm secas em disco para um tempo de teste de 15 minutos.....	20
Tabela 3.7 Impacto da variação da % (m/v) de BSA e da DO na média e desvio padrão de todas as zonas de deteção em nanopartículas de 20 nm secas em disco para um tempo de teste de 15 minutos.....	20
Tabela 3.8 Precisão do teste de PCR.....	24
Tabela 3.9 Exatidão do teste de PCR.....	24
Tabela 3.10 Valores de imprecisão total para a gama alta, média e baixa de PCR e a gama completa com valores de confiança de 95%: LI- limite inferior e LS- limite superior.....	25

## Lista de acrónimos

Acs – Anticorpos

Au – Ouro

BRL – Camada de reconhecimento biológico (*biological recognition layer*)

BSA – Albumina do soro bovino (*bovin seric albumin*)

C1q – Complexo C1

CE – Certificação europeia

DLVO – Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek

DO – Densidade ótica

IFCC - *International Federation of Clinical Chemistry*

IL-1 – Interleucina 1

IL-6 – Interleucina 6

Nps - Nanopartículas

PBS – Tampão fosfato salino (*Phosphate buffered saline*)

PCR – Proteína C reativa

POCT – Testes realizados juntos do paciente (*Point-of-care-testing*)

RIT – Reflexão interna total

SPR – Ressonância de plasmão de superfície (*surface plasmon resonance*)

SPW – Onda de superfície de plasmão (*surface plasmon wave*)

rpm – Rotações por minuto

## Lista de símbolos

$\lambda$  - Comprimento de onda  
 $\Lambda$  - Período do *grating*  
 $\epsilon_m$  – Permissividade elétrica do metal  
 $n_b$  - Índice de refração do dielétrico  
 $\mu$  - Média  
 $\mu g$  – micrograma  
A – Analito  
Au – Ouro  
D – Coeficiente de difusão  
 $D_p$  – Diâmetro da partícula  
h – Altura  
 $I_R$  – Intensidade da radiação refletida  
K – Constante de Boltzman  
 $k_a$  - Constante de associação  
 $K_a$  - Constante de equilíbrio de associação  
 $k_d$  - Constante de dissociação  
 $K_d$  - Constante de equilíbrio de dissociação  
 $k_{ev}$  - Componente vetorial da onda evanescente  
 $k_m$  – Constante de transporte de massa  
 $k_{SP}$  - Onda de propagação do plasmão de superfície  
L – Ligando  
M – Molar  
m – Ordem da onda de difração  
mDA – Miligraus de ângulo  
mg – Miligrama  
mL – Mililitro  
 $\eta$  - Viscosidade  
 $Na_2CO_3$  – Carbonato de sódio  
NaCl – Cloreto de sódio  
nm – Nanómetro  
 $\Theta$  - Ângulo de incidência da luz polarizada  
°C – graus Celsius  
R – Resposta  
Re – Número de Reynolds  
 $R_{eq}$  – Resposta em equilíbrio  
S – Enxofre  
T – Temperatura  
 $V_{m\acute{a}x}$  – Velocidade máxima  
w – largura  
 $\rho$  – Densidade  
 $\sigma$  – Desvio padrão  
 $\phi$  – Fluxo



## 1 – Introdução

Este capítulo foi subdividido em 4 temas, começando com uma breve referência aos testes junto do paciente, do inglês *point-of-care* (*Point-of-care-testing* - POCT), e qual a sua necessidade e principais vantagens. De seguida, foi abordada a teoria adjacente à ressonância de plasmão de superfície do inglês *surface plasmon resonance* (SPR). Posteriormente, foi descrita a teoria da dinâmica molecular, onde são explicados os fenómenos de cinética molecular e o efeito do transporte de massa. O capítulo termina fazendo referência às nanopartículas de ouro (Nps Au) e à proteína C reativa (PCR), respetivamente.

### 1.1 – Testes junto do paciente (POCT - *Point-of-care-testing*)

Os POCT são testes clínicos realizados junto do paciente com o objetivo de fornecerem resultados rápidos e precisos aos clínicos. Estes testes foram desenvolvidos com vista a fornecerem diagnósticos mais otimizados, sendo mesmo em alguns casos decisivos, como por exemplo em episódios cardíacos onde um diagnóstico correto e rápido é determinante para a saúde do paciente [1]. Vieram ainda introduzir melhorias no processo que compreende o momento em que a amostra é recolhida até à entrega do resultado, reduzindo alguns problemas como a degradação ou rotulagem incorreta da amostra [2]. A investigação nesta área começou na década de 50, surgindo nos anos vindouros diversos testes, entre eles a monitorização dos níveis oxigénio no sangue, da frequência cardíaca, testes à urina, gravidez e/ou doenças infecciosas [3].

Atualmente, o grande foco de interesse passa por produzir instrumentos portáteis com precisão comparável a laboratórios centrais, de baixo custo e que necessitem de menor quantidade de amostra, sejam o menos invasivo possível e sejam capazes de realizar vários tipos de testes simultaneamente, como por exemplo nas áreas da hematologia, dos imuno-ensaio e da química clínica [4].

Criada em 2006 e detentora de diversas patentes, a Biosurfit S.A. é uma empresa portuguesa que desenvolveu uma plataforma tecnológica, o spinit® (figura 1.1), que permite realizar testes paramétricos e multiparamétricos, recorrendo ao conceito de *lab-on-a-disc*<sup>1</sup>. Os discos (figura 1.1) desenvolvidos na empresa conjugam a utilização de estruturas microfluídicas com princípios físicos como as forças centrífuga e capilar, com objetivo de mimetizar o procedimento efetuado num laboratório central, numa estrutura menos dispendiosa e obtendo resultados de forma rápida e eficiente. Nestes discos é possível utilizar uma pequena quantidade de sangue capilar (5-15 µl), a qual é colocada diretamente no seu interior, e onde são efetuadas todas as operações de preparação de amostra com os reagentes necessários, apresentando os resultados em menos de 15 minutos.



Figura 1.1 Spinit®, equipamento da Biosurfit S.A. (à esquerda), discos descartáveis pertencentes a diversos testes clínicos (à direita). Adaptado de [6]

<sup>1</sup> Disco que integra uma ou mais funções laboratoriais de modo a alcançar automatização e elevado rendimento, como por exemplo separação do soro [5].

## 1.2 - Ressonância de plasmão de superfície (SPR – *Surface plasmon resonance*)

A técnica de SPR tem vindo a despertar interesse crescente em diversas áreas, destacando-se aplicações na área da eletroquímica, física e biologia [7].

Trata-se de uma técnica bastante robusta na medição de interações biomoleculares em tempo real, como por exemplo a afinidade das interações, taxas de associação e dissociação reais e, a quantificação da concentração de um analito.

Os primeiros trabalhos realizados utilizando esta técnica foram em 1920, mas só na década de 60 é que Otto e Kretschmann verificaram que quando um feixe de luz monocromática incide sobre uma superfície metálica com propriedades de reflexão total, ocorre a diminuição da intensidade de luz refletida. Este fenómeno foi associado à excitação de plasmões de superfície na superfície metálica [8].

Entende-se por fenómeno SPR uma oscilação da densidade de carga longitudinal ao longo da interface entre dois meios, onde um é metal – normalmente ouro – e outro um dielétrico, em condições de reflexão interna total (RIT)<sup>2</sup> e quando ocorre o acoplamento da onda do plasmão de superfície com a onda eletromagnética [9, 10]. Os plasmões de superfície podem ser entendidos como ondas provenientes da oscilação coletiva de eletrões presentes na superfície, devido à penetração de uma radiação eletromagnética.

Nas condições de RIT os fótons refletidos criam um campo elétrico no lado oposto da interface metálica. Os plasmões também criam um campo elétrico, existindo assim um campo elétrico em ambas as faces, denominado de onda evanescente. O campo elétrico gerado possui um alcance de cerca de 300 nm a partir da fronteira entre a solução e a superfície metálica. A amplitude da onda diminui exponencialmente com o aumento da distância a partir da superfície da interface (figura 1.2) [11].

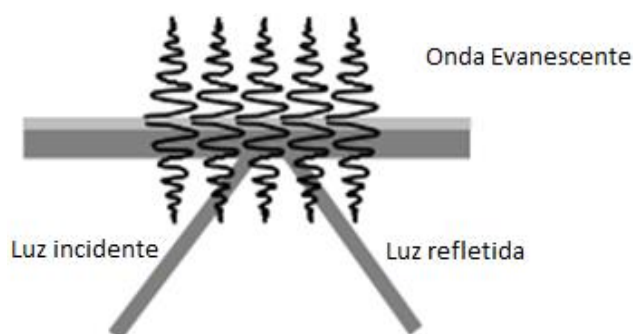


Figura 1.2 Decaimento exponencial da onda evanescente a partir da superfície da interface metálica [11]

### 1.2.1 – Acoplamento por *grating*

A propagação da onda do plasmão de superfície, descrita pela equação 1.1, não pode ser diretamente acoplada a uma onda eletromagnética no dielétrico pois, a sua propagação na interface entre a camada metálica e a dielétrica é sempre superior à onda eletromagnética no dielétrico [12].

$$k_{SP} = \frac{2\pi}{\lambda} \operatorname{Re} \left\{ \sqrt{\frac{\epsilon_m n_b^2}{\epsilon_m + n_b^2}} \right\} > \frac{2\pi}{\lambda} n_b \quad (1.1)$$

onde,  $k_{SP}$  é a parte real da propagação constante da onda de superfície de plasmão (SPW),  $\lambda$  é o comprimento de onda,  $\epsilon_m$  é a permissividade elétrica do metal e  $n_b$  é o índice de refração do dielétrico.

<sup>2</sup> Condição em que o ângulo de incidência iguala o ângulo crítico, passando toda a luz a ser refletida [9].

Existem quatro configurações propostas no acoplamento do plasmão à superfície metálica, o acoplamento em prisma, fibras óticas, sistema de guias de ondas óticas e por *grating* (figura 1.3) [11]. O acoplamento por *grating* é a configuração de acoplamento utilizada no spinit®.

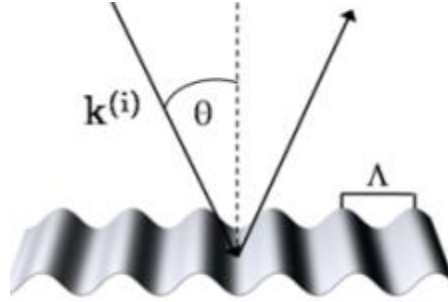


Figura 1.3 Configuração por *grating* utilizada no acoplamento do plasmão à superfície metálica. Superfície metálica periodicamente modelada ( $\Lambda$ ), onde  $\theta$  representa o ângulo de incidência da onda eletromagnética [12].

Na difração por *grating*, uma onda eletromagnética incide sob uma superfície metálica periodicamente modelada com rugosidades perpendiculares ao plano de incidência. Quando a onda de luz incide é separada em duas ondas, uma refletida e outra difratada. A componente do vetor da onda difratada, paralela à superfície, é alterada e a sua constante de propagação pode aumentar por difração e coincidir com a parte real da constante de propagação da SPW, como mostra a equação, [12]

$$\frac{2\pi}{\lambda} n_b \sin(\theta) + m \frac{2\pi}{\Lambda} = \frac{2\pi}{\lambda} \text{Re}\left\{\sqrt{\frac{\epsilon_m n_b^2}{\epsilon_m + n_b^2}}\right\} \quad (1.2)$$

onde  $\theta$  é o ângulo de incidência da onda eletromagnética,  $\Lambda$  é o período do *grating* de difração e  $m$  a ordem da onda de difração. Quando ocorre a igualdade de ambas as constantes de propagação, o acoplamento entre as duas ondas ocorre, permitindo o fenómeno SPR [12].

### 1.2.2 - Métodos de quantificação

O ângulo em que ocorre a ressonância é dependente de vários fatores, por exemplo, das propriedades do filme metálico, do comprimento de onda da luz incidente e do índice de refração do meio [8]. Nesta técnica, o ligando encontra-se retido na superfície, enquanto que o analito está livre em solução possibilitando o contato com a superfície [10]. A concentração de analito que se liga ao ligando, retido na superfície, pode ser quantificada através de dois modos distintos: por intermédio da modulação do comprimento de onda ( $\Delta\lambda$ ) mantendo um ângulo fixo ou através da monitorização das mudanças do ângulo de ressonância ( $\Delta\theta$ ) em que o comprimento de onda da luz incidente é fixo que, através da ligação de diferentes concentrações de analito ( $\Delta C$ ) é equivalente a diferenças no índice de refração ( $\Delta n$ ), como ilustrado na figura 1.4 [7].

Na figura 1.5 está representado um esquema típico do perfil de adsorção, que se dá numa zona de deteção, quantificável através do método de SPR. Neste caso considerando o comprimento de onda fixo e o ângulo de incidência variável, para melhor interpretação deste fenómeno. Numa primeira fase uma solução tampão adequada é colocada em contato com a superfície de forma a ser gerada uma linha basal (A). No instante imediato em que a proteína entra em contato com a superfície, ocorre uma adsorção rápida, que resulta num aumento do ângulo de ressonância da SPR, observando-se um patamar no perfil de adsorção (B). Este patamar deve-se à total cobertura da superfície com a proteína ou pelo facto de se ter atingido o equilíbrio. Por fim, a solução que contém a proteína de interesse é trocada pelo



tampão, que remove somente o material que não se encontra ligado (C). A diferença entre o ângulo de ressonância inicial e final providencia uma indicação sobre a extensão da adsorção [7].

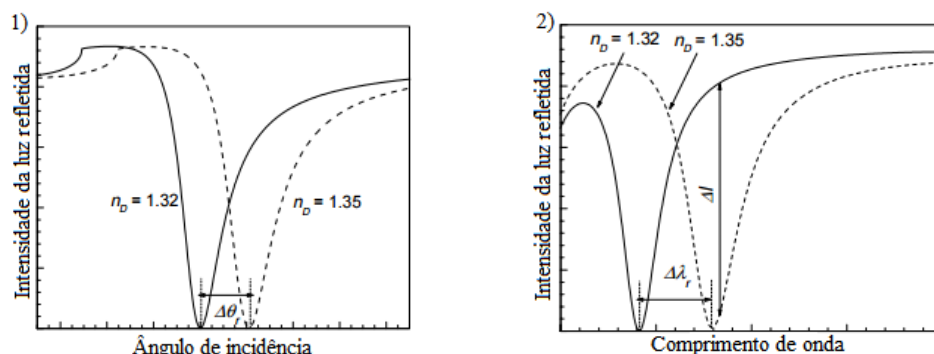


Figura 1.4 Representação gráfica de duas modulações de variação de intensidade de luz refletida. 1) Intensidade da luz refletida em função do ângulo de incidência para um comprimento de onda fixo de duas amostras diferentes. 2) Intensidade da luz refletida em função do comprimento de onda com um ângulo de incidência fixo para duas amostras diferentes. Adaptado de [8].

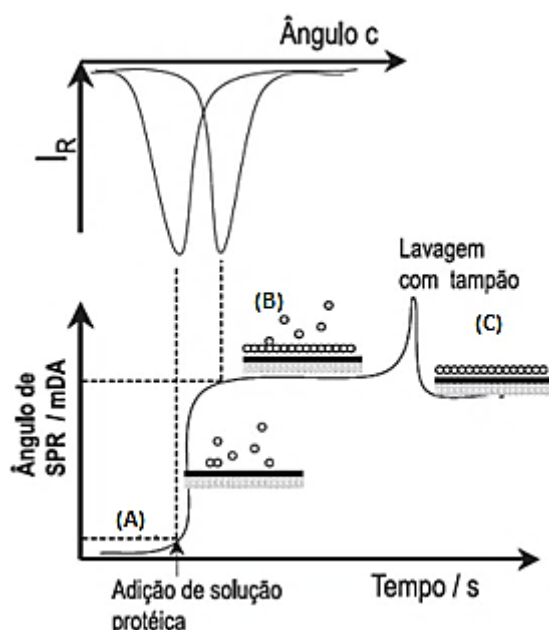


Figura 1.5 Esquema de um perfil de adsorção de uma proteína num método de SPR. A mudança no valor do ângulo de SPR em função do tempo é usada para monitorizar a cinética de adsorção, onde  $I_R$  é a intensidade da radiação refletida e mDA representa miligraus de ângulo. Adaptado de [7].

### 1.2.3 – Construção de uma superfície de reconhecimento biológico (BRL-Biological Recognition Layer)

Os métodos de deteção dos POCT podem ser baseados em anticorpos (Acs) imobilizados numa dada superfície, que vão reconhecer o alvo pretendido, designado de antigénio. Devido ao facto da seletividade e especificidade de um POCT ser essencialmente dependente da sua BRL, os Acs tornam-se elementos de biorechecimento ideais, uma vez que podem apresentar elevada especificidade e afinidade. Apesar dos Acs monoclonais e policlonais serem os que atualmente apresentam um maior número de aplicações no desenvolvimento de testes de diagnóstico, a utilização de Acs recombinantes tem vindo a crescer [13].

Existem alguns parâmetros críticos para a aplicação de Acs no desenvolvimento de biossensores. Estes parâmetros incluem a especificidade, afinidade, estabilidade, capacidade de imobilização (imobilização orientada na superfície) e dimensões da molécula de Ac (densidade da BRL). O desenvolvimento de Acs recombinantes permitiu a otimização destes fatores, essencialmente no que diz respeito à estabilidade, orientação, tamanho e adsorção não específica [13].

Atualmente, as tecnologias de produção de Acs recombinantes permitiram o desenvolvimento de diferentes estruturas de fragmentos de Acs que podem ser aplicadas em diagnóstico (figura 1.6) [13].

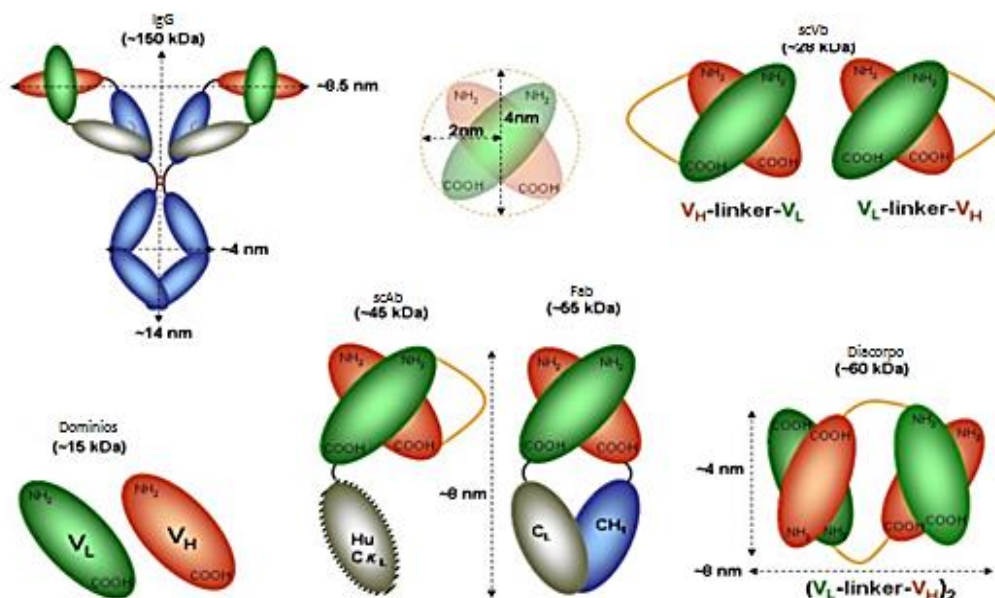


Figura 1.6 Anticorpo e formas recombinantes. VH - domínio variável pesado (vermelho), VL – domínio variável leve (verde), cadeia constante pesada (azul) e cadeia constante leve (cinza) [15].

A utilização de fragmentos de menores dimensões, no desenvolvimento de testes de diagnóstico médico, poderá ser vantajosa, uma vez que torna possível aumentar a densidade de locais de reconhecimento e, teoricamente, aumentar a sensibilidade da deteção [15].

A técnica aplicada na preparação de uma BRL deve ser determinada com base no tipo de ligando (neste caso, o anticorpo), no analito e no método de deteção escolhido. Um aspeto importante a ter em conta é a perda parcial (ou total) da atividade biológica dos Acs quando imobilizados, que se deve essencialmente a dois fatores: alteração da conformação após imobilização e/ou orientação desfavorável, o que impede a ligação do analito. Assim, é fundamental que a atividade do ligando após imobilização seja mantida [16].

Existem diferentes estratégias de imobilização de Acs, entre as quais se destacam a adsorção e a ligação covalente, onde se inclui a imobilização orientada.

A estratégia adotada na imobilização por adsorção pode ser direta ou indireta. A adsorção direta ocorre através de interações hidrofílicas e/ou hidrofóbicas entre o Ac e a superfície do sensor. Para a imobilização indireta são utilizados filmes de polímeros aos quais se ligam os Acs e que irão permitir um espaçamento entre a superfície do sensor e o Ac. Apesar de alguns inconvenientes, como os Acs poderem ficar fisicamente indisponíveis de forma a incapacitar a sua ligação com o antigénio, a adsorção tem sido utilizada devido à sua simplicidade [15].

A ligação covalente direta numa superfície quimicamente ativada é o método mais utilizado para a imobilização de Acs [16]. Por norma, neste método a ligação dá-se de uma forma não orientada através da ligação dos grupos amina livres nos Acs com a superfície quimicamente ativada do sensor, seja através de ácidos carboxílicos (COOH), amins (NH<sub>2</sub>) ou álcoois (OH). Este tipo de ligação é

bastante eficaz e robusta, mas desta também advêm ligações com orientação aleatória que podem provocar a redução de locais de ligação disponíveis [16]. Por forma a minimizar este tipo de problemas, pode optar-se pela estratégia de imobilização covalente orientada, direta ou indireta.

Quando se utiliza ouro na superfície do sensor, as modificações das moléculas baseiam-se essencialmente na introdução de grupos tióis (-SH). As modificações nos Acs podem passar, por exemplo, pela inserção de resíduos de cisteína C-terminal (na zona oposta à zona de reconhecimento), de forma a providenciar uma ligação direta e orientada com a superfície de ouro [16].

A imobilização orientada também pode ser efetivada de forma indireta através da utilização e uma camada intermédia entre o Ac e o filme de ouro. São vários os compostos que podem ser aplicados na formação destas camadas intermédias, dos quais podemos destacar a estreptavidina, dextrano e monocamadas de tióis. No entanto, este tipo de processo necessita que o Ac a imobilizar seja modificado, como é o caso da camada de estreptavidina que obriga à utilização de anticorpos biotilizados [16].

### 1.3 - Teoria da dinâmica molecular

Neste subcapítulo será discutida a dinâmica molecular e parâmetros importantes para a compreensão de toda a parte biofísica/bioquímica do presente trabalho.

#### 1.3.1 - Cinética molecular

Os pressupostos do modelo isotérmico de adsorção de Langmuir são: 1. Todos os sítios de adsorção são equivalentes e podem conter apenas uma molécula. 2. A superfície é energeticamente homogénea e as moléculas adsorvidas não interatuam. 3. Não há transição de fase. 4. Nunca é formada mais do que uma única camada [17].

Se todas as condições acima descritas forem satisfeitas o equilíbrio dinâmico é dado por:



onde L é o ligando, isto é, a espécie imobilizada na BRL e A o analito. As constantes de associação (adsorção) e dissociação (desadsorção) são, respetivamente,  $k_a$  e  $k_d$ .

As cinéticas de interação podem ser subdivididas em três fases: associação, estado estacionário e dissociação. Pode ainda ser admitida uma quarta fase, designada de regeneração, que ocorre quando a dissociação é muito lenta [11].

A associação ocorre quando o analito colide com o ligando devido à difusão com orientação correta e com energia suficiente. A taxa de associação representa o número de eventos de ligação por unidade de tempo e representa-se por:

$$\frac{d[LA]}{dt} = k_a [L][A] \quad (1.4)$$

Por outro lado, a taxa de dissociação é dada por:

$$-\frac{d[LA]}{dt} = k_d [L][A] \quad (1.5)$$

A taxa de reação entre o ligando imobilizado e o analito pode ser estabelecida através da utilização de uma equação cinética de pseudo-primeira ordem. Utilizada pela primeira vez por Lagergren em 1898, é uma das mais empregues na avaliação da adsorção em superfícies sólidas num sistema de adsorção sólido/líquido [18]. Assim, durante a fase de associação, o complexo [LA] aumenta em função do tempo de acordo com:

$$\frac{d[LA]}{dt} = k_a \cdot [L] \cdot [A] - k_d[LA] \quad (1.6)$$

Quando o fluxo de analito permanece tempo suficiente para o sistema atingir o estado estacionário, estamos na presença de analito que é continuamente adicionado e removido por fluxo de amostra. Quando o sistema se encontra em equilíbrio dinâmico temos:

$$k_a[L][A] = k_d[LA] \quad (1.7)$$

As constantes de equilíbrio de associação,  $K_A$ , e dissociação,  $K_D$ , podem ser representadas respetivamente por:

$$K_A = \frac{[L][A]}{[LA]} = \frac{k_d}{k_a} \quad (1.8)$$

$$K_D = \frac{[LA]}{[L][A]} = \frac{k_a}{k_d} \quad (1.9)$$

Quando o analito que se encontra no fluxo é substituído somente por tampão, a concentração de analito livre decresce até ser nula. É nesta fase que se inicia a dissociação [11].

A equação de resposta (R) por parte do sistema é dada por,

$$R = R_{eq}(1 - e^{-(k_a C + k_d)(t - t_0)}) \quad (1.10)$$

onde  $R_{eq}$  é a resposta em equilíbrio,  $t$  e  $t_0$  tempo final e inicial respetivamente e  $C$  a concentração [11].

### 1.3.2 - Transporte de massa

A limitação do transporte de massa é causada essencialmente pelo facto da substância a analisar e dos locais na superfície da zona de deteção, inicialmente, estarem localizados em pontos fisicamente diferentes. Isto provoca a necessidade de transportar o analito até à superfície na fase de associação, e transporta-lo para longe da superfície na fase de dissociação. A ligação do analito ao ligando é um evento de dois passos. Em primeiro lugar o analito é transferido do fluxo de massa para a superfície da zona de deteção e, em segundo lugar, é feita a ligação do analito ao ligando.

A geometria de uma zona de deteção é caracteristicamente retangular, apresentando uma largura ( $w$ ) entre  $10^{-1}$  e  $10^{-2}$  cm e uma altura ( $h$ ) entre  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$  cm.

O fluxo pode ser caracterizado pelo número de Reynolds ( $Re$ ), conceito introduzido por George Gabriel Stokes em 1851 [19]:

$$Re = \frac{\rho \phi}{\eta h} \quad (1.11)$$

onde  $\eta$  e  $\rho$  são a viscosidade e a densidade do fluido, respetivamente, e  $\phi$  o fluxo, isto é, volume de fluido que passa através da zona de deteção por unidade de tempo. A significância fundamental do  $Re$  baseia-se na premissa de permitir avaliar a estabilidade do fluxo, podendo indicar se este flui de forma laminar ou turbulenta. Se o  $Re$  for inferior a 2100, espera-se que o fluxo seja laminar, caso contrário é turbulento [19]. Dada a dimensão da zona de deteção, espera-se que o fluxo permaneça em regime laminar.

O coeficiente de difusão ( $D$ ) mede o movimento de translação das moléculas em solução e é dependente de três fatores: diminui com o aumento do tamanho da molécula, diminui com o aumento da viscosidade do solvente e aumenta com a subida da temperatura. Este é dado por,

$$D = \frac{kT}{3\pi\eta d_p} \quad (1.12)$$

onde  $k$  é a constante de Boltzmann ( $1,38 \times 10^{-23}$  J/K),  $T$  a temperatura,  $\eta$  a viscosidade do solvente e  $d_p$  o diâmetro da partícula. Assim, analito presente na solução deve em primeiro lugar difundir-se até à superfície para interatuar com o ligando imobilizado. Se esta taxa de difusão for mais lenta que a taxa de associação, os efeitos do transporte de massa são observados. Devido a este facto, na fase de associação vai ser criada uma zona de depleção, em que a concentração junto à superfície é menor do que longe da superfície. Na fase de dissociação cria-se uma zona de retenção do analito perto da superfície, permitindo que o analito dissociado volte a ligar-se aos locais livres antes de escapar para o fluxo de massa. Este gradiente diminui continuamente com o passar do tempo [21].

A transferência de massa depende das dimensões da zona de deteção, do coeficiente de difusão do analito e da taxa de fluxo da solução de acordo com a seguinte equação [22],

$$k_m \approx 1,28 \left( \frac{v_{\text{máx}} D^2}{hw} \right)^{\frac{1}{3}} \quad (1.13)$$

onde  $v_{\text{máx}}$  é a velocidade máxima.

Assim, a formação do complexo LA pode ser influenciada pela constante de transporte de massa,  $k_m$ . Esta influência pode-se dar tanto da solução para a interface como da interface para a solução, como representado nas equações 1.13 e 1.14, respetivamente.

$$k_{a \text{ obs}} = \frac{k_a}{1 + \frac{k_a [L]}{k_m}} \quad (1.14)$$

$$k_{d \text{ obs}} = \frac{k_d}{1 + \frac{k_d [L]}{k_m}} \quad (1.15)$$

onde o  $k_a$  é o  $k_{a \text{ obs}}$  sem o efeito do  $k_m$ . O  $k_a$  passará a ser designado por  $k_a$  ideal.

#### 1.4 - Nanopartículas de ouro (Nps Au)

Nps Au, também conhecidas como ouro coloidal, são partículas de ouro nanométricas em suspensão [23]. Estas possuem elevado potencial em aplicações biológicas, diagnóstico, deteção de drogas, entre outras [24]. As Nps Au apresentam uma elevada biocompatibilidade e, ao contrário de outras nanopartículas metálicas, não oxidam [24, 25].

A estabilização eletrostática de uma solução coloidal de nanopartículas é descrita pela teoria de Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO), que afirma que a estabilidade do sistema é determinada pelo balanço entre as forças atrativas de van der Waals e repulsivas eletrostáticas [26]. De modo a providenciar uma correta estabilização das Nps Au, após o processo de conjugação é imperativo que o meio não se altere (por exemplo alterações do pH, temperatura, entre outros) de modo a não afetar a densidade de cargas à superfície das Nps Au. Assim, além do conjugado, adiciona-se um agente estabilizador de forma a aumentar as forças repulsivas eletrostáticas, como por exemplo a BSA [27, 28].

## 1.5 - Proteína C reativa (PCR)

Descoberta em 1930 por Tillett e Francis, a proteína C reativa (PCR) (figura 1.7) faz parte de um conjunto de proteínas de fase aguda cuja concentração plasmática aumenta ou diminui em resposta a quase todas as inflamações e infeções do corpo humano.

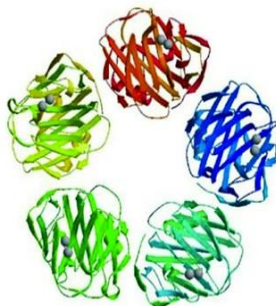


Figura 1.7 Estrutura terciária da proteína C reativa. Adaptado de [29]

A PCR é uma proteína homopentamérica e cada subunidade possui 224 aminoácidos. A sua concentração aumenta após um estímulo inflamatório, resultado de um acréscimo da sua síntese no fígado [30]. As citocinas são responsáveis pela síntese da PCR, entre as quais se destacam a interleucina 6 (IL-6) e a interleucina 1 (IL-1).

Esta proteína apresenta importantes funções a nível imunitário agregando-se com fatores intrínsecos (como por exemplo lipoproteínas danificadas) e extrínsecos (como por exemplo fosfolípidos de microrganismos). Esta agregação é detetada pelo primeiro subcomponente do complexo C1 (C1q), ativando a via clássica do sistema complemento.

Os valores plasmáticos da PCR durante a fase aguda não apresentam variação ao longo do dia e não são afetados pela ingestão de comida. Ao invés, os níveis da PCR são afetados pelo consumo excessivo de algumas drogas e pelo mau funcionamento do fígado [31]. Pela facilidade na sua quantificação, torna-se num marcador inflamatório de grande interesse.

Por norma, a análise à PCR é solicitada pelo profissional de saúde em quatro situações distintas: para fazer um *screening* de forma a detetar a presença de inflamação, para monitorização de uma inflamação existente, para detetar a existência de doenças orgânicas e, por fim, para diagnósticos diferenciais de doenças inflamatórias [31].

As concentrações de normalidade de PCR e o seu significado clínico no soro humano encontram-se mencionadas na tabela 1.1.

Tabela 1.1 Valor serológico da proteína C reativa e o seu significado clínico. Adaptado de [32]

PCR (mg/L)	5-10	10-50	51-200	>200
Significado clínico	Não significativo, mas não exclui possibilidade de existência de processo inflamatório em fase de evolução	Ligeiro – Reações inflamatórias ligeiras	Moderado – infeções bacterianas e outros processos inflamatórios ativos	Elevados – infeções e outros processos inflamatórios, neoplásicos ou necróticos tecidulares graves

## 1.6 – Objetivos

Esta dissertação teve como principal objetivo a investigação e decréscimo do tempo de ensaio da PCR efetuado no spinit®, utilizando como técnica espectral a ressonância de plasmão de superfície. O

objetivo contempla o estudo de diversas velocidades de fluxo de forma a reduzir o tempo de ensaio sem comprometer a *performance* do ensaio.

## 2 - Materiais e Métodos

### 2.1 – Equipamento e disco

Todos os ensaios realizados no âmbito desta tese foram efetuados na plataforma spinit®, pertencente à Biosurfít S.A.. Esta plataforma contempla três módulos diferentes de detecção, o módulo de microcopia, o módulo de absorvância e o módulo de SPR. No contexto desta dissertação foi apenas relevado o módulo de SPR. O módulo de SPR é constituído por um laser cuja luz atravessa um polarizador, seguido de uma lente de focagem (figura 2.1 A). Ao incidir no disco (especificamente na zona de detecção, onde se encontra a BRL), parte da luz polarizada é refletida até atingir um fototransistor e, devido à presença de um espelho, é novamente refletida, desta vez até uma câmara onde o sinal é convertido em pixel.

A figura 2.1 B mostra um sensograma onde (A) representa a entrada da amostra na zona de detecção, (B) devido à entrada das Nps Au existe uma amplificação do sinal comparativamente ao sinal obtido apenas pela entrada da amostra e (C) após a entrada do tampão ocorre uma lavagem das Nps Au que não estão ligadas à PCR.

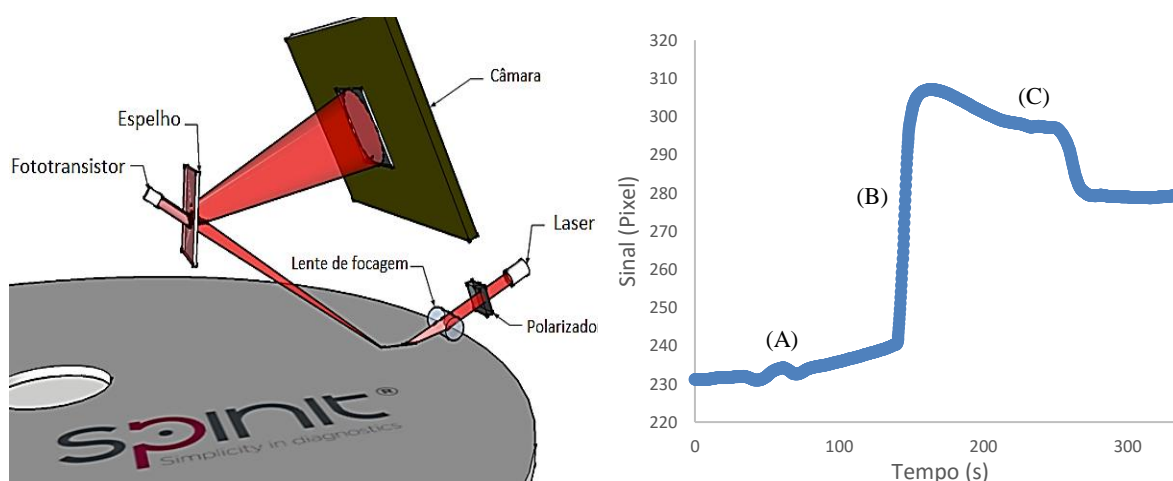


Figura 2.1 A) Componentes do módulo de SPR presente no spinit®. B) Sensograma. A – Aumento de sinal devido à entrada da amostra na zona de detecção B – Aumento de sinal devido à entrada das Nps Au na zona de detecção. C – Entrada de tampão de lavagem.

O disco destina-se a ser utilizado em conjunto com o instrumento spinit®, na determinação quantitativa da PCR como método de diagnóstico. A construção do disco é composta por diversas fases (figura 2.2), é iniciada com dois discos de policarbonato com 0,6 mm de espessura cada, designados de tampa (onde posteriormente será adicionada a BRL nas 12 zonas de detecção) e disco de microfluídica (onde se encontra moldada toda a microfluídica adjacente a este teste). A construção da BRL na tampa tem lugar através da deposição de filmes de ouro e posterior adição dos scAbs sobre o disco que contém uma configuração em *grating*.

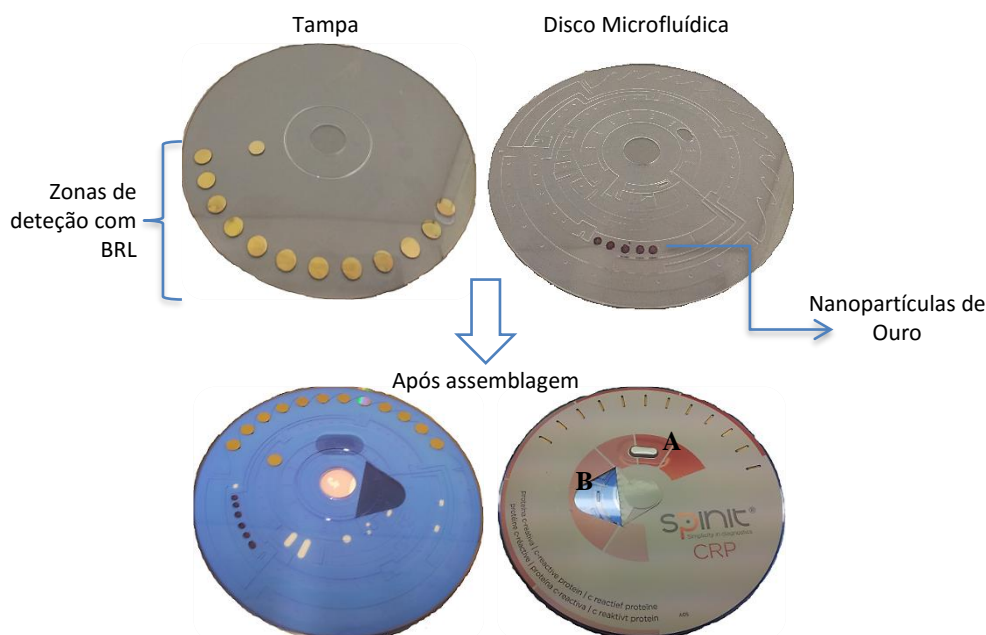


Figura 2.2 Constituição do disco da PCR. A – blister com tampão. B – Local de colocação do sangue capilar.

As Nps Au são colocadas e secas no disco da microfluídica, anteriormente conjugadas com scAbs anti-PCR. Após montagem, efetuada com auxílio de um filme hidrofílico, é colocado um *blister* (figura 2.2 A) que contém o tampão usado durante o ensaio. Por último, é colocada uma *label* informativa do teste em questão.

As reações biológicas têm lugar nas zonas de detecção devido à existência da BRL. Numa primeira fase a PCR liga-se aos scAbs da BRL e de seguida as Nps Au previamente conjugadas com scAbs ligam-se à PCR (figura 2.3).

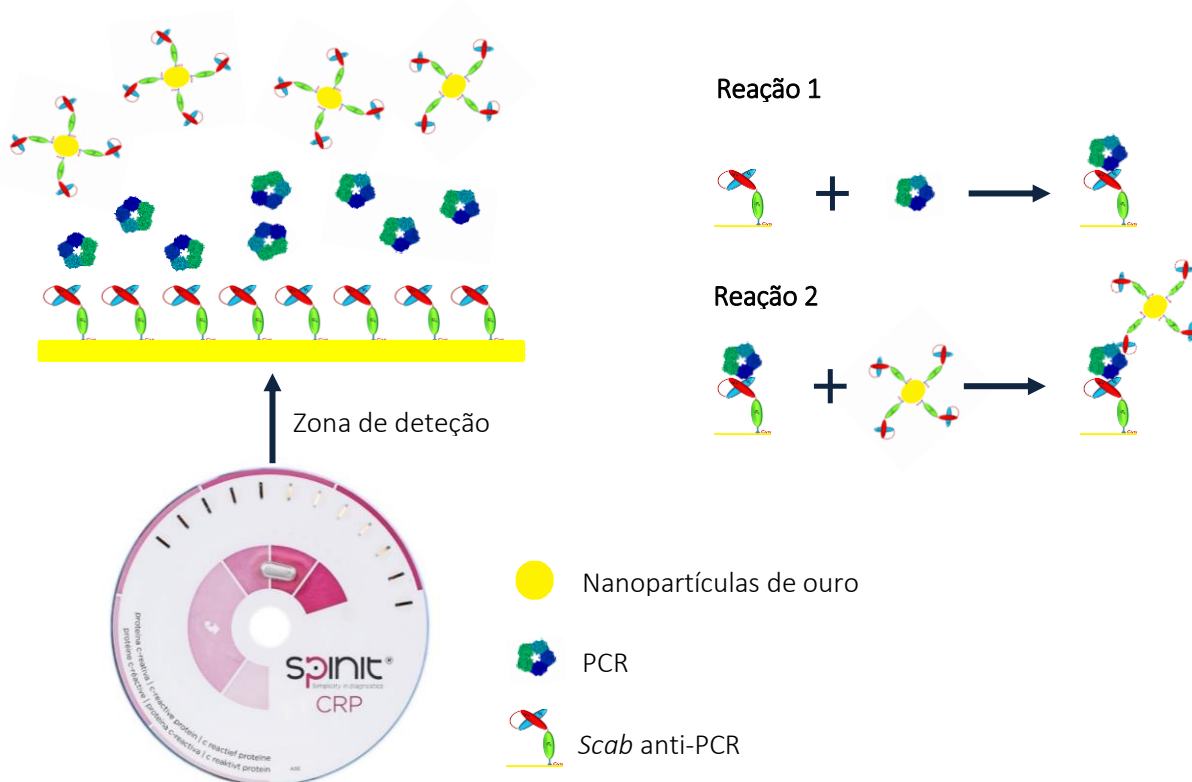


Figura 2.3 Constituição da camada de reconhecimento biológico (BRL), e respetivas reações biológicas.



## 2.2 – Reagentes e material biológico

Os reagentes e material biológico utilizados no processo de conjugação das Nps Au com scAbs anti-PCR encontram-se enumerados na tabela 2.1.

**Tabela 2.1** Reagentes e material biológico utilizado no processo de conjugação de nanopartículas de ouro.

Reagente/Material biológico	Marca
Nanopartículas de ouro (Nps Au)	BBI Solutions
Tampão fosfato-salino (PBS 1x)	Gibco
Albumina do soro bovino (BSA)	Sigma-Aldrich
Carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )	Sigma-Aldrich
Cloreto de sódio (NaCl)	Sigma-Aldrich
Trealose	Life sciences

### 2.2.1 – Conjugação de nanopartículas ouro

Com vista a obter a melhor condição de conjugação, estabilização e desempenho, foram otimizados três parâmetros:

- Determinação da concentração de scAbs necessária para cobrir toda a superfície da Nps Au;
- Percentagem de BSA necessária para que possamos ter um sistema mais estável possível;
- Densidade ótica (DO) saturante das Nps Au. Isto é, determinação da concentração de Nps Au necessária para se ligarem a todas as PCR quando estas são saturantes em todas as zonas de deteção (PCR ligada a todos os scAbs na BRL).

No que diz respeito ao primeiro ponto, foi-se estudar diferentes concentrações de scAbs para cada diâmetro de Nps Au utilizado, como mostra a tabela 2.2. Todas as projeções teóricas relativas à concentração de scAbs encontram-se calculadas no Anexo A. O procedimento seguido consistiu no acerto do pH das Nps Au para o intervalo entre 7-8 através da adição de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,2 M. A partir de cada concentração de scAbs previamente preparada, foram retirados 25  $\mu\text{L}$  e adicionados a 100  $\mu\text{L}$  de Nps Au. Este preparado foi colocado sob agitação, ao escuro e à temperatura ambiente. Por fim, foi adicionado metade do volume total de NaCl 1 M por cada microtubo.

**Tabela 2.2** Concentrações de scAbs em estudo para diferentes diâmetros de Nps Au.

Diâmetro (nm)	Concentração de scAbs ( $\mu\text{g/mL}$ )
15	2 ; 2,5 ; 3
20	2 ; 3 ; 4
40	2 ; 3 ; 4 ; 5 ; 7 ; 10

Após selecionada a concentração de scAbs a usar para cada diâmetro, foi-se otimizar a percentagem de BSA a adicionar à solução de Nps-scAbs. A BSA foi adicionada à solução, incubada à temperatura ambiente na ausência de luz sob agitação. Em seguida, foram realizadas centrifugações, a temperatura controlada num tempo estipulado. Após finalizada esta etapa, retirou-se o sobrenadante. As diversas centrifugações às quais esta solução foi sujeita têm como objetivo a lavagem, de forma a retirar os scAbs livres, e concentração da mesma.

No final, foi medida a densidade ótica (DO) da solução e acertada para uma DO final pretendida. Inicialmente foram realizadas diversas soluções com DO's diferentes de forma a se proceder a uma otimização da mesma. À solução com a DO requerida, adicionou-se trealose e foi colocada sob agitação, protegida da luz e à temperatura ambiente. Até à sua utilização, a solução final foi mantida a  $5 \pm 3$  °C.

## 2.3 – Validação analítica

A marcação CE é um indicativo de conformidade obrigatória para diversos produtos comercializados no espaço económico europeu. Esta certifica que um produto cumpre os requisitos da legislação da união europeia em matéria de segurança, higiene e proteção ambiental, estando desta forma, credenciada a circular por todo o espaço económico europeu [33].

Para se obter uma marcação CE é necessário identificar os requisitos de um determinado produto na união europeia. De seguida é feita uma verificação ao produto em questão, esta verificação inclui uma validação analítica, de forma a constatar se este cumpre os requisitos especificados e, se tal se verificar, apresentar um *dossier* técnico com todos os documentos comprovativos, podendo assim, o fabricante pode colocar a marcação CE no produto [33].

A aceitabilidade do teste spinit®-PCR é determinada por um conjunto de verificações internas, das quais estão incluídas as verificações que estão inseridas na validação analítica de diversos parâmetros, e pela garantia de que os resultados obtidos se situam dentro dos critérios de aceitação (tabela 2.3).

**Tabela 2.3** Requerimentos da validação.

Parâmetro	Objetivo	Critério de aceitação
Gama dinâmica	Estabelecer a gama linear do ensaio através de diluições de calibradores.	Gama linear entre 4 e 180 mg/L
Precisão	Estabelecer precisão através da utilização de soluções controlo.	Coefficiente de Variação (CV) $\leq 10\%$ Repetibilidade (R) $\leq 15\%$
Exatidão	Estabelecer exatidão usando material de referência certificado.	bias $\leq 2\%$ relativamente ao material de referência e CV $\leq 10\%$
Imprecisão total	Estabelecer precisão total através de medições repetidas de soluções controlo selecionadas durante um ciclo envolvendo um mínimo de 15 dias.	CV $\leq 10\%$
Equivalência	Estabelecer a equivalência ao método de referência usando amostras de soro de doentes com concentrações elevadas, médias e baixas de PCR, analisadas em ambos os sistemas (spinit® e método de referência selecionado).	Regressão linear entre o método de referência e as recuperações do spinit® com coeficiente de correlação $r > 0.95$ ; bias $\leq 2\%$ e CV $\leq 10\%$
Soluções de controlo externo	Estabelecer especificações de soluções controlo para uso interno e externo.	CV $\leq 10\%$ Especificações de controlo para o sistema spinit®-PCR: valor médio $\pm$ total de erro admissível.
Tratamento de dados	Identificação dos processos e fórmulas para serem utilizadas no tratamento e análise de dados.	

Todos os protocolos utilizados na elaboração dos ensaios referentes à validação analítica foram realizados de acordo com as *guidelines* das entidades reguladoras em vigor [34, 35]. A gama dinâmica foi realizada com 9 concentrações de PCR em duplicado, incluindo concentrações de PCR superiores e inferiores à gama dinâmica. As soluções foram preparadas internamente a partir de 2 soluções de calibração e realizadas diluições sucessivas, posteriormente quantificadas num laboratório central. Estes ensaios foram realizados com 1 lote de discos e testados em 2 spinit®. A precisão foi realizada com 6 soluções controlo, cada uma testada 20 vezes num período de 15 dias. A exatidão foi efetuada com o material de referência ERM®-DA474 do IFCC (*International Federation of Clinical Chemistry*) através da realização de 20 ensaios, todos realizados no mesmo dia. A equivalência entre métodos foi efetuada com 188 ensaios, proveniente de réplicas efetuadas no spinit® e posteriormente no método de referência (Siemens, Advia 2400). Das 94 amostras, 30 pertenciam à gama baixa, 30 à gama média e 30 à gama

alta e 2 amostras abaixo e acima dos limites inferior e superior, respetivamente. As especificações das soluções controlo foram definidas pela elaboração de 20 ensaios de cada um dos 6 controlos durante 5 dias com 3 lotes de discos e 2 spinit® diferentes. As fórmulas utilizadas no cálculo das especificações encontram-se enunciadas no anexo B.

### 2.3.1 – Aprovação de um lote de produção

Todos os ensaios realizados para a marcação CE foram efetuados em discos pertencentes a lotes de produção. De forma a garantir que o lote em questão se encontrava em conformidade, isto é, sem problemas que pudessem vir a impactar resultados futuros, todos os lotes foram submetidos a um controlo de qualidade estrutural e funcional.

No controlo de qualidade estrutural incluiu-se a observação da estrutura microfluídica, de forma a verificar se esta continha anormalidades que fossem passíveis de comprometer o ensaio, como por exemplo partículas que possam interferir com a circulação do líquido pelos canais. O controlo de qualidade funcional inclui a elaboração de uma curva de calibração, à qual foram recuperadas soluções controlo com especificações internas, de forma a determinar a qualidade do lote.

## 3 – Resultados e discussão

Partindo do teste de PCR existente na empresa com uma duração de 15 minutos e com 5 a 100 mg/L de gama de deteção, numa primeira fase foram efetuadas experiências variando o tempo de teste de forma a tentar apurar se, com o diâmetro das Nps Au atuais (10 nm), era possível diminuir o tempo de teste sem alterar a gama de deteção.

Na figura 3.1 encontra-se representado um gráfico do sinal total (Amostra + Nps Au) obtido na primeira zona de deteção, em função do tempo contabilizado a partir da entrada da amostra na zona de deteção e a saída das Nps Au da mesma. Foram fixadas diferentes velocidades de entrada de amostra e a redução do tempo foi causada pelo aumento da velocidade de entrada das Nps Au (Anexo D). Com a observação do gráfico, verifica-se que o aumento de velocidade de entrada, quer das Nps Au quer da amostra na zona de deteção, tem impacto no sinal obtido, sendo sempre menor face ao controlo, cuja velocidade de entrada da amostra e de Nps Au na zona de deteção é 1700 rotações por minuto (rpm).

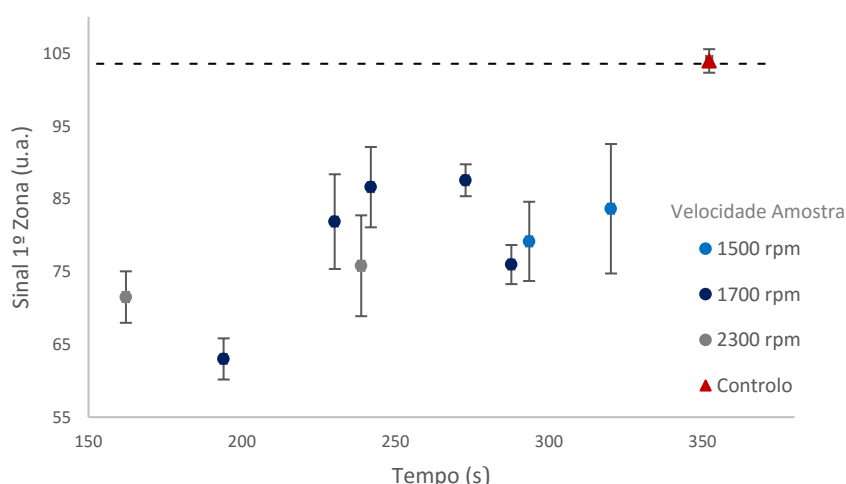


Figura 3.1 Comparação do tempo compreendido entre a entrada da amostra na zona de deteção e a saída das Nps Au da mesma e sinal total da primeira zona de deteção correspondente a 100 mg/L de PCR. Azul claro corresponde a uma rotação da amostra de 1500 rpm, azul escuro a 1700 rpm e cinza a 2300 rpm. O triângulo vermelho corresponde ao controlo (1700 rpm/1700 rpm). Barras de erro correspondentes ao desvio padrão.

Tendo em consideração que a geometria da zona de detecção permaneceu constante, segundo a equação 1.13, com o aumento da velocidade o  $k_m$  também aumenta. Este aumento tem como consequência, tendo em conta a equação 1.14, uma aproximação do  $k_a$  observado a um  $k_a$  ideal. Assim, um aumento da velocidade de passagem da amostra ou das Nps Au pela zona de detecção teve como resultado um aumento na taxa da adsorção (figura 3.2 e 3.3 e anexo D). Contudo, este aumento não se verificou na totalidade do sinal obtido (figura 3.1) porque o tempo de residência do analito (que possui um volume fixo) na zona de detecção é diferente para diferentes velocidades e, como consequência, obtivemos sinais totais menores para velocidades maiores. A tendência foi mantida tanto para velocidades de rotação de Nps Au diferentes e de amostra constante, como para o inverso.

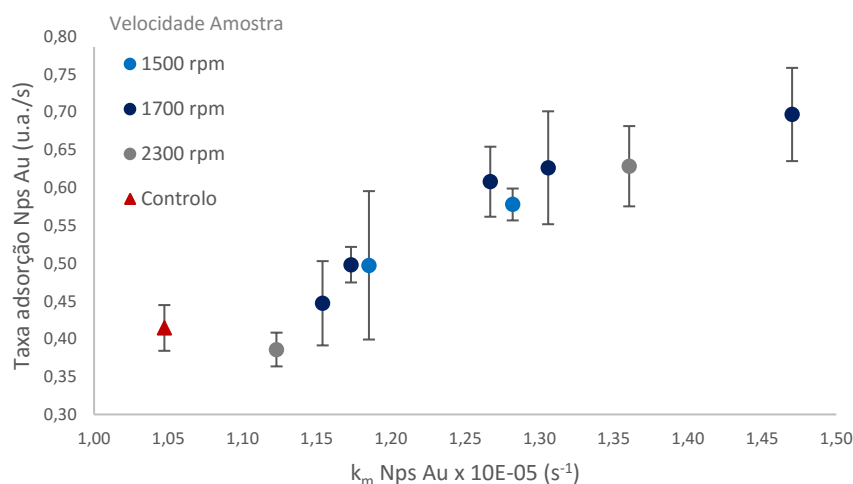


Figura 3.2 Relação entre o  $k_m$  (s<sup>-1</sup>) das Nps Au e a taxa de adsorção (u.a./s) correspondente a 100 µg/mL de PCR. Azul claro corresponde a uma rotação das Amostra de 1500 rpm, azul escuro a 1700 rpm e cinza a 2300 rpm. Triângulo vermelho corresponde ao controlo (1700 rpm / 1700 rpm). Barras de erro correspondentes ao desvio padrão.

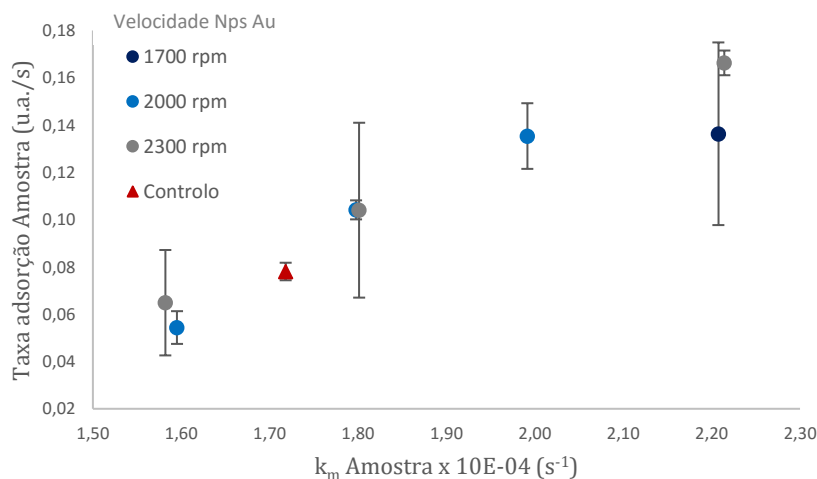


Figura 3.3 Relação entre o  $k_m$  (s<sup>-1</sup>) da amostra e a taxa de adsorção (u.a./s) correspondente a 100 µg/mL de PCR. Azul claro corresponde a uma rotação das Nps Au de 2000 rpm, azul escuro a 1700 rpm e cinza a 2300 rpm. Triângulo vermelho corresponde ao controlo (1700 rpm / 1700 rpm). Barras de erro correspondentes ao desvio padrão.

Através da equação 1.15 foi possível obter um sinal teórico previsto normalizado ao sinal teórico do controlo. A previsão teórica comparada com os dados experimentais encontra-se ilustrada na figura 3.4.

Através da observação do gráfico é possível constatar que o declive da previsão experimental ( $-96425 \pm 17947$ ) é semelhante ao declive teórico ( $-115439 \pm 1560$ ) tendo em conta o erro, entrando em consideração que uma aproximação teórica é sempre limitante. Mostrando a tendência de decréscimo

de sinal com a diminuição do tempo de teste e, que esta tendência corrobora com as previsões teóricas.

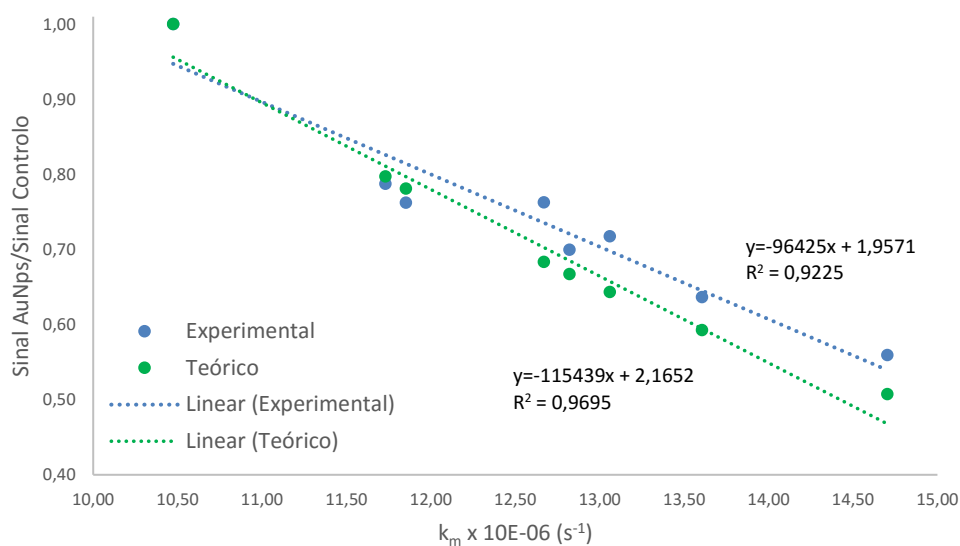


Figura 3.4 Relação entre os  $k_m (s^{-1})$  e os sinais normalizados ao sinal controlo, para dados obtidos experimentalmente e teoricamente através da equação 1.15.

Devido ao facto dos objetivos propostos se focarem na diminuição do tempo de teste, mantendo a da gama de deteção, e tendo em conta os resultados anteriormente enunciados, tornava-se inexecutável o cumprimento dos objetivos com as nanopartículas de 10 nm. Assim, a abordagem seguinte passou por aumentar o diâmetro das mesmas, de forma a aumentar a amplificação. Entraram em estudo as Nps Au com 15, 20 e 40 nm de diâmetro. Devido a novas necessidades de mercado foi proposto um novo objetivo, aumentar a gama de deteção.

A conjugação das Nps Au com diferentes diâmetros teve que ser otimizada de forma a garantir a estabilidade das mesmas. Uma primeira fase de otimização passou pela determinação da concentração de scAbs a utilizar durante o processo de conjugação. As concentrações de scAbs utilizadas foram escolhidas (tabela 3.1) com base nos cálculos teóricos efetuados (Anexo A), tendo em conta o diâmetro das Nps Au.

Tabela 3.1 Concentrações de scAbs em estudo para diferentes diâmetros de Nps Au.

Diâmetro (nm)	Concentração de scAbs ( $\mu g/mL$ )
15	2 ; 2,5 ; 3
20	2 ; 3 ; 4
40	2 ; 3 ; 4 ; 5 ; 7 ; 10

Na figura 3.5, é possível observar que as Nps Au de 15 nm não agregam em nenhuma das concentrações em estudo. O critério de escolha da concentração de scAbs a ser utilizada posteriormente foi de 1  $\mu g/mL$  superior à mínima concentração de scAbs em que não ocorreu agregação de Nps Au. Devido a este facto, nos testes seguintes, as Nps Au de 15nm foram conjugadas com scAbs a uma concentração de 3  $\mu g/mL$

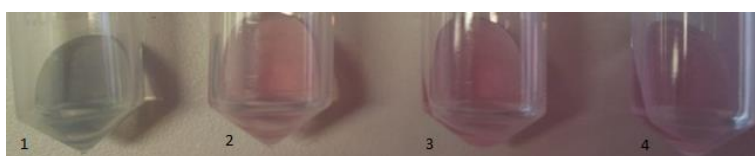


Figura 3.5 Nanopartículas de ouro de 15 nm conjugadas com scAbs anti-Proteína C reativa a diferentes concentrações. 1 – Controlo negativo (0  $\mu g/mL$ ) ; 2 – 2  $\mu g/mL$  ; 3 – 2,5  $\mu g/mL$  ; 4 – 3  $\mu g/mL$ .

Quanto às Nps Au de 20 nm o estudo efetuado está representado na figura 3.6. Como observado, estas concentrações foram suficientes para cobrir toda a superfície da Nps Au durante o processo de conjugação e impedir a sua agregação quando adicionado o NaCl. Assim, com a utilização do mesmo critério de seleção, a concentração escolhida foi 3  $\mu\text{g/mL}$ .



Figura 3.6 Nanopartículas de ouro de 20 nm conjugadas com scAbs anti-Proteína C reativa a diferentes concentrações. 1 – Controlo negativo (0  $\mu\text{g/mL}$ ) ; 2 - 2  $\mu\text{g/mL}$  ; 3 – 3  $\mu\text{g/mL}$  ; 4 – 4  $\mu\text{g/mL}$ .

No caso das Nps Au de 40 nm a figura 3.7 mostra que a concentração mínima necessária para que não ocorresse agregação foi de 5  $\mu\text{g/mL}$ . Assim, com a utilização do mesmo critério de escolha, a concentração selecionada foi 6  $\mu\text{g/mL}$ .



Figura 3.7 Nanopartículas de ouro de 40 nm conjugadas com scAbs anti-Proteína C reativa a diferentes concentrações. 1 – Controlo negativo (0  $\mu\text{g/mL}$ ) ; 2 - 2  $\mu\text{g/mL}$  ; 3 – 3  $\mu\text{g/mL}$  ; 4 – 4  $\mu\text{g/mL}$  ; 5 – 5  $\mu\text{g/mL}$  ; 6 – 7  $\mu\text{g/mL}$  ; 7 – 10  $\mu\text{g/mL}$ .

Comparando as concentrações teóricas de scAbs necessárias para cobrir toda a superfície das Nps Au (Tabela 3.2), tornou-se possível verificar que a concentração experimental para as Nps Au de 15 e 20 nm foi inferior à teórica, mas a concentração para as Nps Au de 40 nm foi superior à calculada. Isto deve-se ao facto dos resultados teóricos terem sido calculados idealizando um empacotamento perfeito dos scAbs. Desta forma, seria de esperar que as concentrações experimentais fossem menores face às teóricas obtidas previamente, tendo como hipótese os graus de liberdade dos scAbs e como consequência um empacotamento não perfeito dos mesmos, mas tal não foi verificado nas Nps Au de maior diâmetro. Estas necessitaram de uma concentração de scAbs superior a 100% face ao calculado.

Tabela 3.2 Concentrações teóricas e experimentais necessárias para cobrir toda a superfície de nanopartículas de 15, 20 e 40 nm de diâmetro.

Diâmetro (nm)	Teórico ( $\mu\text{g/mL}$ )	Experimental ( $\mu\text{g/mL}$ )
15	4,63	2
20	4,11	2
40	2,12	5

Este facto pode ser explicado à luz do aumento linear das forças atrativas de *van der waals* com o diâmetro das Nps Au [26]. Assim, mesmo que toda a superfície da Nps Au se encontre revestida de scAbs, estes não são suficientes para manter as forças eletrostáticas repulsivas superiores face às atrativas quando adicionada uma grande quantidade de sal ao sistema. Uma razão que pode explicar este fenómeno tem a ver com a necessidade de haver uma concentração de scAbs tão elevada tal que cubra toda a superfície da Np Au e que a sua quantidade no tampão evite a agregação das mesmas. Note-se

que a quantidade de PBS adicionado aumenta com a diminuição da concentração de scAbs. Desta forma com concentrações menores de scAbs o sistema possui maior quantidade de sais, contribuindo para a agregação observada nas menores concentrações. O que se pretendia era que a velocidade de agregação de Nps Au pela adição de sais seja inferior à ligação de scAbs, de forma a possuímos um sistema o mais estável possível.

A garantia da estabilidade das suspensões coloidais é de extrema importância para a observação dos fenômenos físicos e biológicos reportados neste trabalho. Para tal, e como descrito por diversos autores [25, 26], a lavagem/concentração das Nps Au são geralmente efetuadas na presença de estabilizadores. O estabilizador utilizado no decorrer desta investigação foi a BSA. Assim, após determinar a concentração mínima necessária de scAbs para revestir a superfície das Nps Au, foi necessário determinar a melhor percentagem de BSA a utilizar. Em paralelo foi determinada a DO saturante de Nps Au. Esta é a concentração mínima necessária de Nps Au para que, com uma concentração elevada de PCR (saturante em todas as zonas de detecção), existam Nps Au s suficientes capazes de amplificar todo o sinal resultante da ligação da PCR à BRL. Se tal não se verificar, observa-se um decréscimo de sinal ao longo das zonas de detecção. Os ensaios posteriormente enunciados foram elaborados com as Nps Au em solução e com um tempo de teste de 15 minutos.

Para as Nps Au de 15 nm foram testadas quatro DO diferentes para três percentagens de BSA distintas. Através da análise da tabela 3.3 observou-se uma relação inversamente proporcional entre a percentagem de BSA e a média de sinal total obtido em todas as zonas de detecção, indicando que BSA a 1 % (m/v) demonstrou ser a mais favorável para o sistema. Tendo em consideração a diferença percentual em termos de sinal entre a última zona e a primeira zona, a DO mínima saturante foi 15,7.

Para as Nps Au de 20 nm as condições aplicadas encontram-se descritas na tabela 3.4. Relativamente à influência da percentagem de BSA no sinal obtido, com 3 % (m/v) de BSA o sinal obtido pareceu ser tendencialmente menor que as restantes percentagens. A DO saturante foi 30,22.

Em relação às Nps Au de 40 nm as condições testadas encontram-se enunciadas na tabela 3.5. Através das diferenças percentuais entre a última e a primeira zona de detecção verificou-se que o sistema não se encontrava estável. A diferença percentual bastante positiva foi uma indicação de uma solução coloidal de nanopartículas não estável, isto é, a solução de nanopartículas possuía agregados. As Nps Au não agregadas ligar-se-iam às primeiras zonas de detecção (devido ao maior coeficiente de difusão), enquanto que os agregados se ligariam às últimas zonas de detecção, o que provocaria um aumento do sinal nestas zonas.

Tabela 3.3 Impacto da variação da % (m/v) de BSA e da DO na média e desvio padrão de todas as zonas de detecção em nanopartículas de 15 nm em solução para um tempo de teste de 15 minutos.

% (m/v) BSA	OD	Média ( $\mu$ ) do Sinal Total em todas as zonas (u.a.)	Desvio Padrão ( $\sigma$ ) do Sinal Total em todas as zonas (u.a.)	% Diferença da última zona em relação à primeira zona
1	51,8	173,9	14,4	5,12
	36,5	187,2	12,6	-9,40
	15,7	187,2	8,3	0,94
	6,3	149,4	20,3	-33,64
3	32,2	136,3	14,4	17,84
	24,3	135,9	5,4	-0,69
	10,0	142,0	7,1	-5,40
	4,6	105,3	11,4	25,12
5	39,7	120	8,3	-6,61
	25,4	141,3	7,5	-7,91
	11,7	127,0	10,4	-0,88
	4,8	88,7	7,0	16,60

Tabela 3.4 Impacto da variação da % (m/v) de BSA e da DO na média e desvio padrão de todas as zonas de detecção em nanopartículas de 20 nm em solução para um tempo de teste de 15 minutos.

% (m/v) BSA	OD	$\mu$ do Sinal Total em todas as zonas (u.a.)	$\sigma$ do Sinal Total em todas as zonas (u.a.)	% Diferença da última zona em relação à primeira zona
1	32,10	141,84	12,24	-18,47
	18,82	155,60	10,49	-24,87
	10,47	124,60	23,43	-60,75
	8,91	86,66	33,11	-138,27
3	48,78	208,65	7,52	-1,21
	30,22	206,11	9,33	-4,17
	11,39	94,22	24,07	-99,87
5	50,82	179,53	14,34	-8,07
	39,62	192,41	6,14	-4,64
	24,92	137,27	16,07	-34,69
	15,96	106,44	16,01	-59,58

Tabela 3.5 Impacto da variação da percentagem de BSA e da DO na média e desvio padrão de todas as zonas de detecção em nanopartículas de 40 nm secas em disco para um tempo de teste de 15 minutos

% (m/v) BSA	OD	$\mu$ do Sinal Total em todas as zonas (u.a.)	$\sigma$ do Sinal Total em todas as zonas (u.a.)	% Diferença da última zona em relação à primeira zona
5	102,22	263,27	28,69	29,76
7	185,00	378,25	34,08	16,58
	165,51	211,94	45,31	-71,22
	71,24	402,88	29,50	-16,71
	49,86	435,75	41,05	2,30
10	217,14	399,03	65,58	13,18

Foram selecionadas duas percentagens de BSA e DO, prosseguindo o estudo com a assemblagem de discos utilizando Nps Au. Devido a conhecimento adquirido previamente pela empresa, a DO saturante em líquido é sempre menor à DO saturante em sólido devido a um acréscimo de outra variável, a ressuspensão das Nps Au. Esta ressuspensão não é efetuada de forma perfeitamente otimizada, pelo que a DO saturante em ensaios realizados com Nps Au secas no disco aumenta.

Para as Nps Au de 15 nm iniciaram-se os ensaios com 1% (m/v) de BSA e 3% (m/v) de BSA, ambas com DO de 25. Esta DO demonstrou ser não saturante e para 1% (m/v) de BSA o sinal obtido foi maior. De seguida, fixou-se a percentagem de BSA em 1% (m/v), mas a DO foi aumentada para 39. Esta DO ainda não apresentou sinais de ser saturante, pelo que se aumentou novamente para 50. Para este valor já foram verificados indícios de ser saturante devido à diferença percentual entre a última zona de detecção e a primeira ser próxima de zero (tabela 3.6). Assim as condições de BSA e DO definidas para as Nps Au de 15 nm foram 1%(m/v) e 50, respetivamente.



Tabela 3.6 Impacto da variação da % (m/v) de BSA e da DO na média e desvio padrão de todas as zonas de deteção em nanopartículas de 15 nm secas em disco para um tempo de teste de 15 minutos. Ensaios efetuados em duplicado.

% (m/v) BSA	DO	$\mu$ do Sinal Total em todas as zonas (u.a.) n=2	$\sigma$ do Sinal Total em todas as zonas (u.a.) n=2	Diferença da última zona em relação à primeira zona. n=2	$\sigma$ Diferença da última zona em relação à primeira zona. n=2
1	25	171,98	11,28	-15,58	1,57
3	25	142,20	11,85	-19,05	10,41
1	39	263,74	15,46	-14,26	6,11
1	50	220,09	7,62	-3,73	2,94

Para as Nps Au de 20 nm, as condições definidas inicialmente foram BSA 3% (m/v) com DO 40 e BSA 5% (m/v) com DO 38. As DOs testadas não foram saturantes e, em média, com BSA a 3% (m/v) o sinal foi ligeiramente superior à BSA a 5% (m/v), pelo que de seguida foram testados discos com 1% (m/v) BSA e 3% (m/v) BSA, com DO a 44 e 60, respetivamente. A BSA 1% (m/v) teve um sinal superior à BSA 3% (m/v), e em ambos a DO não aparentou ser saturante. Por fim foram realizados ensaios com BSA 1% (m/v) e DO 55, que por sua vez demonstrou ser saturante (tabela 3.7).

Tabela 3.7 Impacto da variação da % (m/v) de BSA e da DO na média e desvio padrão de todas as zonas de deteção em nanopartículas de 20 nm secas em disco para um tempo de teste de 15 minutos.

% (m/v) BSA	DO	$\mu$ do Sinal Total em todas as zonas (u.a.) n=2	$\sigma$ do Sinal Total em todas as zonas (u.a.) n=2	Diferença da última zona em relação à primeira zona. n=2	$\sigma$ Diferença da última zona em relação à primeira zona. n=2
3	40	219,71	22,48	-25,91	8,74
5	38	208,36	19,14	-13,64	0,56
1	44	294,99	17,35	-11,58	4,96
3	60	202,99	14,15	-10,18	3,30
1	55	310,34	9,74	-3,70	0,19

Relativamente às Nps Au de 40 nm foram realizados alguns ensaios preliminares cuja instabilidade verificada nos ensaios com as Nps Au em solução permaneceu e, não foi determinada uma DO saturante. Devido a este facto as Nps Au de 40 nm deixaram de ser objeto de estudo.

Uma vez estabelecidas as percentagens de BSA e DO das Nps Au em testes de 15 minutos, voltou-se ao objetivo inicial de diminuir o tempo de teste. Para o efeito foram aumentadas as velocidades de entrada nas zonas de deteção da amostra e das Nps Au. Os sinais totais foram comparados entre tempos de teste e constatou-se que com a sua diminuição de tempo de ensaio não se verifica diminuição

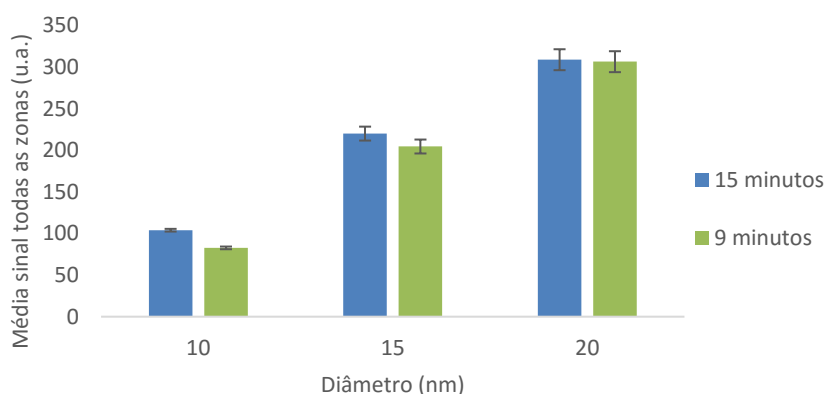


Figura 3.8 Relação entre a os diâmetros das Nps Au (nm) e o tempo de teste (minutos) com o sinal total obtido (u.a.) com uma concentração de PCR saturante (200 mg/L). Barras de erro correspondem ao desvio padrão.

de sinal adquirido (figura 3.8). A velocidade de entrada na zona de deteção das Nps Au e da amostra

estipuladas para o tempo de ensaio de 9 minutos foram 2100 rpm.

Tendo em consideração o coeficiente de difusão teórico calculado a partir da equação (1.12) (figura 3.9 A) e, sabendo que as velocidades são um fator comum em todas as Nps Au, o  $k_m$  vai diminuindo consoante o diâmetro da nanopartícula aumenta.

Posto isto, seria de esperar que a taxa de adsorção tivesse uma relação diretamente proporcional ao diâmetro da Np Au, mas tal não se verifica. Mas, ao retirar o fator  $k_m$  e obtendo a adsorção real das Nps Au (figura 3.9 B), percebe-se que o impacto da ligação de uma Np Au de 20 nm à PCR, em termos de sinal, é maior que o impacto causado por uma Np Au de 15 nm e 10 nm. O mesmo se aplica à Np Au de 15 nm em relação à 10 nm.

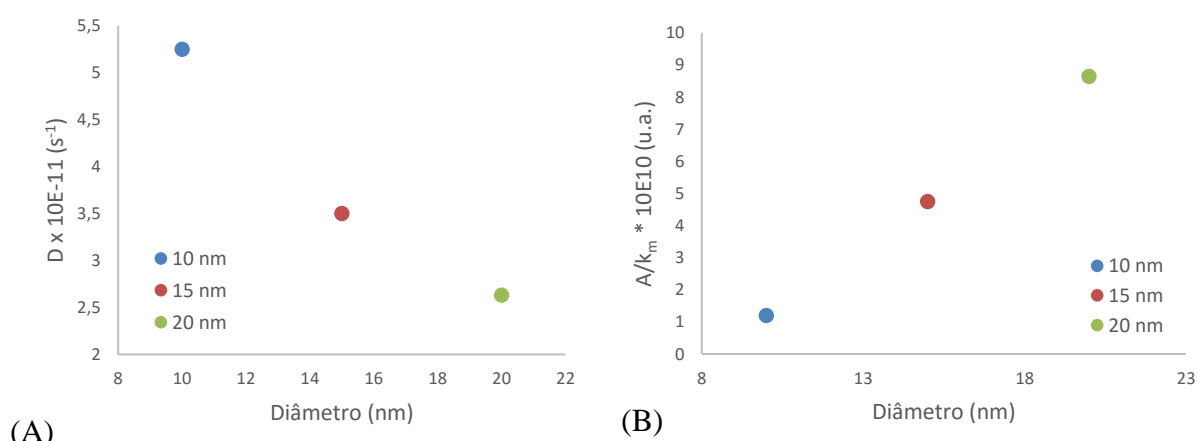


Figura 3.9 A) Relação entre os diâmetros das Nps Au (nm) e o coeficiente de difusão calculado a partir da equação (1.12) ( $\text{m}^2/\text{s}$ ). B) Relação entre o diâmetro da Np Au e o rácio entre a adsorção e o  $k_m$  teórico calculado a partir da equação (1.13) (u.a.).

Devido ao facto do sinal total obtido com um tempo total de ensaio de 9 minutos ser superior com as Nps Au de 20 nm face às de 15 e 10 nm (figura 3.8), o estudo foi prosseguido com Nps Au de 20 nm.

Após uma nova necessidade de mercado propôs-se um objetivo específico relativamente ao tempo de ensaio, este teria que ser menor que 6 minutos. Portanto foi elaborado um estudo comparativo entre o desempenho das Nps Au de 20 nm com 9 minutos e 6 minutos de ensaio, cuja velocidade de entrada das Nps Au e amostra é 2700 rpm.

Acompanhando o crescimento por parte da empresa, surgiu a necessidade de transferir a conjugação e concentração das Nps Au para uma empresa externa especializada. A necessidade surgiu de forma a obter lotes Nps Au conjugadas mais reprodutíveis entre si e, com finalidade de aumentar a escala de produção de discos. A passagem do processo produtivo de Nps Au conjugadas implicou uma aprendizagem por parte da empresa externa de todo o protocolo desenvolvido na Biosurfit S.A, mas, em condições de produção mais especializadas.

A comparação dos sinais obtidos para 9 minutos, 6 minutos (Nps Au conjugadas na Biosurfit) e 6 minutos (Nps Au conjugadas na empresa externa) encontram-se ilustrados na figura 3.19.

Se se diminuir o tempo de teste e mantiver a conjugação na Biosurfit o sinal total obtido decresce em  $42\% \pm 1\%$ , enquanto que comparado com a conjugação efetuada numa empresa externa especializada não ocorre decréscimo de sinal total. Devido aos resultados obtidos todos os lotes de descaráveis foram produzidos com Nps Au conjugadas na empresa externa.

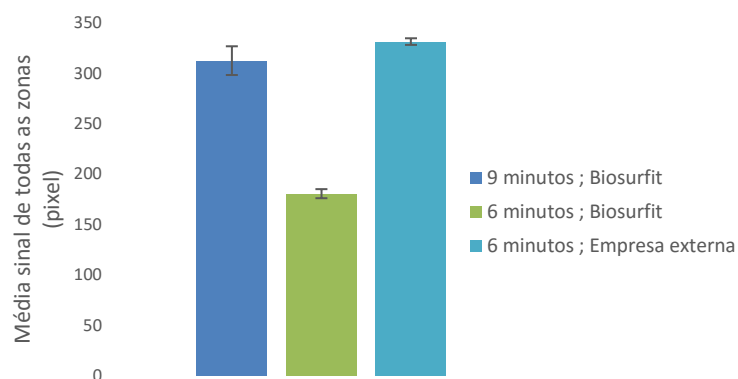


Figura 3.10 Relação entre o tempo (9 e 6 minutos) e o local de conjugação das Nps Au (biosurfit e empresa externa) e o sinal total obtido (u.a.) para 160 µg/mL de PCR. Barras de erro correspondentes ao desvio padrão.

Como referido no ponto 2.3.1, a calibração dos lotes de discos é efetuada através de curvas de calibração para cada um dos lotes produzidos. Esta calibração tem como premissa o facto de cada zona de deteção ter a sua zona de operação (figura 3.11). Como se observa na primeira zona de deteção existe uma saturação de sinal na gama alta, na última zona de deteção não existe resolução na distinção da gama baixa. Assim, e através de uma métrica proprietária da Biosurfit S.A que combina a informação de todas as zonas de deteção, obtém-se uma reta com recuperações dos calibradores utilizados (figura 3.12).

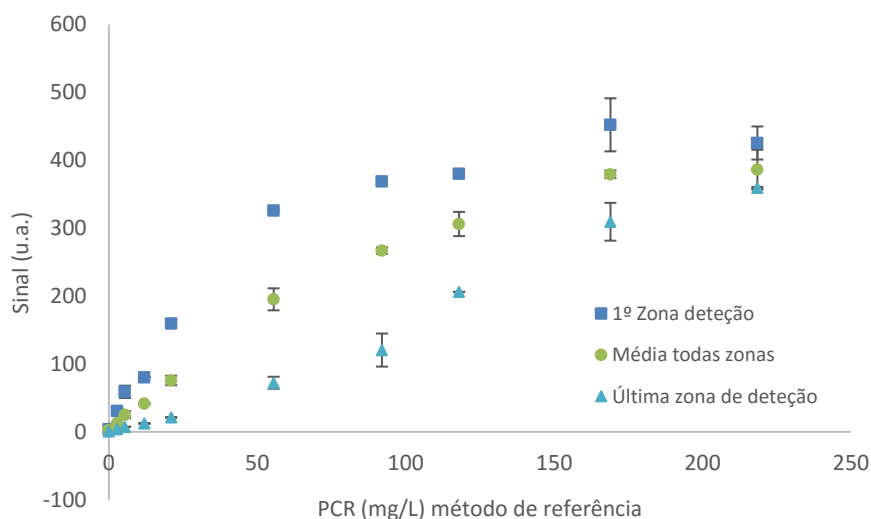


Figura 3.11 Relação entre o valor de PCR e o sinal da primeira zona de deteção (azul escuro, quadrado), média de sinal em todas as zonas de deteção (verde, bola) e sinal da última zona de deteção (azul claro, triângulo). Método de referência: Siemens ADVIA 2400.

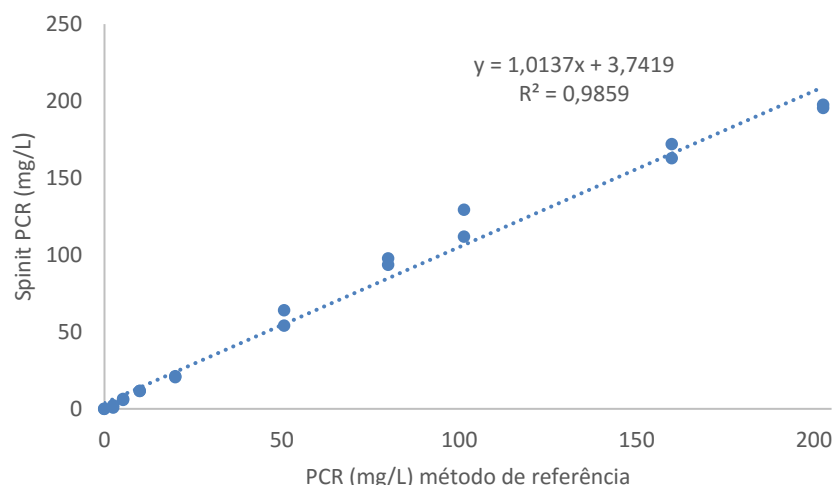


Figura 3.12 Relação entre o valor de PCR obtido pelo método de referência e pelo spinit®. Método de referência: Siemens ADVIA 2400.

Tendo-se atingido o objetivo de reduzir o tempo de teste para 6 minutos e aumentado o sinal, logo a gama dinâmica, prosseguiu-se para a validação analítica.

A gama dinâmica do teste foi verificada por meio de ensaios de linearidade cujo resultado foi 2,9 a 191 mg/L de PCR. Como a linearidade tem que se verificar também fora da gama dinâmica, esta possui um intervalo aceitável de 4-180 mg/L especificado para o sistema spinit® PCR (figura 3.13). Caso a concentração se encontre fora da gama o resultado apresentado será  $< 4$  mg/L ou  $> 180$  mg/L.

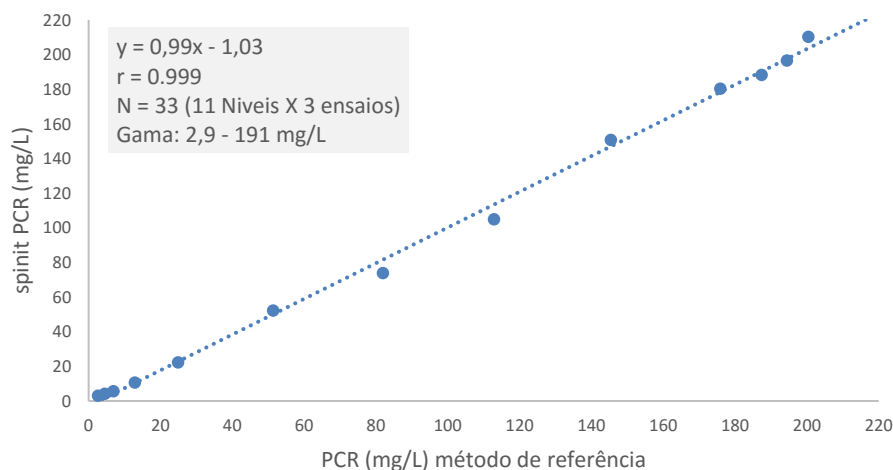


Figura 3.13 Linearidade do teste numa gama de 2,9 a 191 mg/L. Método de referência: Siemens ADVIA 2400

De forma a verificar se a calibração foi bem efetuada são elaborados ensaios com controlos, os quais são calculados a partir de uma curva de calibração gerada.

Os resultados da medição e duplicado de soluções controlo distribuídas ao longo dos testes de gama dinâmica, estão apresentados na tabela 3.8.

Tabela 3.8 Precisão do teste de PCR.

Amostra	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5	Amostra 6
PCR (mg/L)	7.8	13.8	27.4	72.6	95.6	156.8
CV Total (%)	9.9	8.9	6.7	6.2	6.0	6.6
Repetibilidade (%)	7.4	8.1	3.5	4.1	4.1	4.0

Relativamente à exatidão, o teste da PCR é rastreável de acordo com o material de referência ERM®-DA474 do IFCC (*International Federation of Clinical Chemistry*). O valor determinado (40,6 mg / L) está contido dentro do intervalo de incerteza especificada para o material de referência testado ( $41,2 \pm 2,5$  mg/L). Os testes realizados com o material certificado estão resumidos na tabela 3.9.

Tabela 3.9 Exatidão do teste de PCR.

Tipo de amostra	N	Concentração média de PCR	CV%	Bias%
ERM-DA474 do IFCC*	20	$41.2 \pm 2.5$ mg/L	6.6	-1.5
*Material de referência				

A equivalência entre o sistema spinit® e um método de referência estabelecido para a quantificação da PCR, foi avaliada através da análise de regressão dos valores calculados a partir de amostras de pacientes. O desempenho do sistema spinit® foi comparado com o desempenho do sistema Siemens ADVIA 2400 em atividade num laboratório de análises clínicas certificado (figura 3.14 e tabela 3.10).

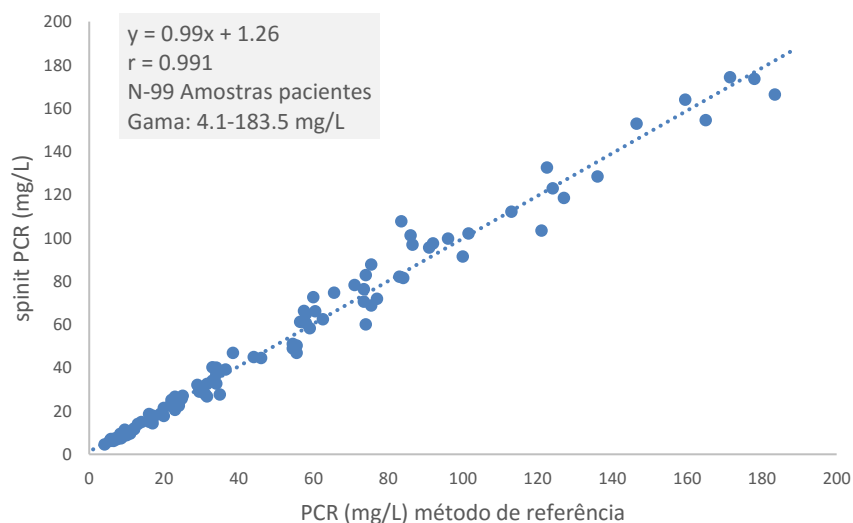


Figura 3.14 Equivalência do teste spinit®-PCR com o método de referência: Siemens ADVIA 2400 numa gama de 4,1 a 183,5 mg/L.

Tabela 3.10 Valores de imprecisão total para a gama alta, média e baixa de PCR e a gama completa com valores de confiança de 95%: LI- limite inferior, LS- limite superior e CI – intervalo de confiança.

PCR (mg/L)	4.1 - 22.0	22.0 – 60.0	60.0 – 183.5	4.1 – 183.5
IMPRECISÃO				
TOTAL (%)	6.6	6.8	5.3	6.3
95% CI –LI	5.3	5.4	4.3	5.5
95% CI -LS	8.7	9.0	7.0	7.3
BIAS (%)				
95% CI –LI	-3.5	-2.3	-2.5	-1.4
95% CI -LS	3.8	6.4	3.8	3.2
N	34	32	33	99

Na tabela do anexo C encontra-se enunciado resumidamente os resultados obtidos da marcação CE referente à melhoria efetuada no disco da PCR. Concluindo, os resultados gerados permitiram submeter a marcação CE com sucesso.

#### 4 – Conclusões e perspetivas futuras

A partir de um teste com duração de 15 minutos e uma gama dinâmica de PCR compreendida entre 5 a 100 mg/L, o tempo foi reduzido para 6 minutos e a gama dinâmica aumentada para um intervalo entre 4 e 180 mg/L.

Estas melhorias foram atingidas através da aplicação de dois fatores em simultâneo: aumento de diâmetro das Nps Au e aumento da velocidade de fluxo da entrada da amostra e das Nps Au nas zonas de deteção. O diâmetro de Np Au selecionado de entre os estudados foi de 20 nm devido à obtenção de um sinal superior face ao obtido com Np Au com diâmetros inferiores e à falta de estabilidade por parte das Nps Au de 40 nm.

O sinal obtido com Np Au de 20 nm em ensaios de 15 minutos face a 9 minutos, não diminui, mas, quando o tempo de ensaio decresce para 6 minutos ocorre um decréscimo significativo de sinal ( $42\% \pm 1\%$ ). Após transferência da conjugação das Nps Au para uma empresa externa especializada, o sinal obtido com um tempo de teste de 6 minutos passa a ser semelhante ao sinal obtido com um tempo de teste de 9 e 15 minutos. Devido a este facto, estavam reunidas todas as condições para iniciar a validação analítica da melhoria do produto através da marcação CE.

A gama dinâmica do ensaio verificado por meio de testes de linearidade contém o intervalo aceitável de 4-180 mg/L, especificado para o sistema spinit® PCR, sendo que a linearidade do sistema encontra-se compreendida entre 2,9 a 191 mg/L.

A exatidão foi verificada usando um material de referência certificado ERM-DA474/IFCC. O valor significativo determinado (40,6 mg/L) está contido dentro do intervalo de incerteza especificada para o material de referência testado ( $41,2 \pm 2,5$  mg/L).

A precisão foi avaliada através da medição de soluções controlo, sendo que todos foram especificados e preencheram os critérios de aceitação.

No estudo de comparação de métodos, os resultados confirmam a equivalência substancial com o método selecionado (Ensaio imuno-turbidimétrico Siemens ADVIA da proteína C-reativa) e originou uma estimativa de imprecisão total em amostras de soro para o intervalo de ensaio completo de 6,3%.

Após finalizado o processo de marcação CE do produto, este encontra-se atualmente disponível comercialmente.

Como perspetivas futuras estão possíveis otimizações a nível de custos de produção, assim como melhorias a nível de tempo de ciclo produtivo e taxas de rejeição do teste.

## 5 - Referências bibliográficas

- 1- Zaloga, G. P., 1990: Evaluation of bedside testing options for the critical care unit. *CHEST Journal*, **97**, 185S-190S.
- 2 - Baer, D. M. and R. E. Belsey, 1990: The evolving regulatory environment and bedside metabolic monitoring of the acute care patient. *CHEST Journal*, **97**, 191S-197S.
- 3 - Janasek, D., J. Franzke and A. Manz, 2006: Scaling and the design of miniaturized chemical-analysis systems. *Nature*, **442**, 374-380.
- 4 - Chin, C. D., V. Linder and S. K. Sia, 2012: Commercialization of microfluidic point-of-care diagnostic devices. *Lab on a Chip*, **12**, 2118-2134.
- 5 - Volpatti, L. R., & Yetisen, A. K. 2014: Commercialization of microfluidic devices. *Trends in biotechnology*, **32(7)**, 347-350.
- 6 - "Company | Biosurfit." Biosurfit. N.p., n.d. Web. Mar.-Apr. 2016.
- 7 - Green, R. J., R. A. Frazier, K. M. Shakesheff, M. C. Davies, C. J. Roberts and S. J. Tendler, 2000: Surface plasmon resonance analysis of dynamic biological interactions with biomaterials. *Biomaterials*, **21**, 1823-1835.
- 8 - Homola, J., H. Vaisocherová, J. Dostálek and M. Piliarik, 2005: Multi-analyte surface plasmon resonance biosensing. *Methods*, **37**, 26-36.
- 9 - Nagata, K. and H. Handa, 2000: *Real-time analysis of biomolecular interactions*. Springer.
- 10 - Nguyen, H. H., J. Park, S. Kang and M. Kim, 2015: Surface plasmon resonance: a versatile technique for biosensor applications. *Sensors (Basel, Switzerland)*, **15**, 10481-10510.
- 11 - Marquart, J.A. "SPRpages Home." SPRpages Home. N.p., n.d. Web. Mar.-Apr. 2016.
- 12 - Homola, J., I. Koudela and S. S. Yee, 1999: Surface plasmon resonance sensors based on diffraction gratings and prism couplers: sensitivity comparison. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **54**, 16-24.
- 13 - Ruffato, G., Romanato, F., & Zacco, G., 2012: Innovative exploitation of grating-coupled surface plasmon resonance for sensing. *INTECH Open Access Publisher*.
- 14 - Conroy, P. J., Hearty, S., Leonard, P., & O'Kennedy, R. J., 2009: Antibody production, design and use for biosensor-based applications. In *Seminars in cell & developmental biology*, Vol. 20, No. 1, pp. **10-26**. Academic Press.
- 15 - Viguier, C., Crean, C., & O'Kennedy, R. 2012: Trends and perspectives in immunosensors.
- 16 - O'Shannessy, D. J., Brigham-Burke, M., & Peck, K. 1992: Immobilization chemistries suitable for use in the BIAcore surface plasmon resonance detector. *Analytical biochemistry*, **205(1)**, 132-136.
- 17 - Saerens, D., Huang, L., Bonroy, K., & Muyldermans, S. 2008: Antibody fragments as probe in biosensor development. *Sensors*, **8(8)**, 4669-4686.
- 18 - Madou, M., Zoval, J., Jia, G., Kido, H., Kim, J., & Kim, N. 2006: Lab on a CD. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, **8**, 601-628.
- 19 - Yuh-Shan, H., 2004: Citation review of Lagergren kinetic rate equation on adsorption reactions. *Scientometrics*, **59**, 171-177.
- 20 - Stokes, G. G. 1851: On the effect of the internal friction of fluids on the motion of pendulums Vol. 9, p. **8**. Pitt Press.
- 21 - Homola, J., 2006: Surface Plasmon Resonance Sensors. *Springer Series on Chemical and Biosensors*. Vol. 4.
- 22 - Schuck, P., & Zhao, H. 2010: The role of mass transport limitation and surface heterogeneity in the biophysical characterization of macromolecular binding processes by SPR biosensing. *Surface plasmon resonance: methods and protocols*, **15-54**.

- 23 - Myszka, D. G., He, X., Dembo, M., Morton, T. A., & Goldstein, B. 1998: Extending the range of rate constants available from BIACORE: interpreting mass transport-influenced binding data. *Biophysical journal*, **75**(2), 583-594.
- 24 - Mody, V. V., Siwale, R., Singh, A., & Mody, H. R. 2010: Introduction to metallic nanoparticles. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, **2**(4), 282
- 25 - Raoof, M., Corr, S. J., Kaluarachchi, W. D., Massey, K. L., Briggs, K., Zhu, C., ... & Curley, S. A. 2012: Stability of antibody-conjugated gold nanoparticles in the endolysosomal nanoenvironment: implications for noninvasive radiofrequency-based cancer
- 26 - Jain, P. K., Huang, X., El-Sayed, I. H., & El-Sayed, M. A. 2008: Noble metals on the nanoscale: optical and photothermal properties and some applications in imaging, sensing, biology, and medicine. *Accounts of chemical research*, **41**(12), 1578-1586.
- 27 - Murcia, M. J., & Naumann, C. A. 2007: Biofunctionalization of fluorescent nanoparticles. *Nanotechnologies for the life sciences*.
- 28 - El-Sayed, I. H., Huang, X., & El-Sayed, M. A. 2006: Selective laser photo-thermal therapy of epithelial carcinoma using anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles. *Cancer letters*, **239**(1), 129-135.
- 29 - PortalesMedicos. "PortalesMedicos.com, El Portal De La Medicina Y La Salud." PortalesMedicos.com. N.p., n.d. Web. 17 Março 2016.
- 30 - Sokolov, K., Follen, M., Aaron, J., Pavlova, I., Malpica, A., Lotan, R., & Richards-Kortum, R. 2003: Real-time vital optical imaging of precancer using anti-epidermal growth factor receptor antibodies conjugated to gold nanoparticles. *Cancer research*, **63**(9), 1999-2004.
- 31 - Black, S., I. Kushner and D. Samols, 2004: C-reactive protein. *Journal of Biological Chemistry*, **279**, 48487-48490.
- 32 - Saúde, Joaquim Chaves. "Joaquim Chaves Saúde." Joaquim Chaves Saúde. N.p., n.d. Web. Apr.-May 2016.
- 33 - "Official Website of the European Union -Please Choose a Language." EUROPA - European Union Website, the Official EU Website. N.p., n.d. Web. 15 Jun. 2016.
- 34 - Evaluation of Linearity Performance of quantitative analytical methods; Proposed Guideline – Vol. 6, No. 18 (1986) CLSI/NCCLS, EP6-P.
- 35 - Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples; Approved Guideline – Second Edition, Vol22 No.19 (2002) CLSI/NCCLS, EP9-A2



## 7 - Anexos

### A - Cálculos da concentração teórica de scAbs

Nos cálculos efetuados admitimos que a base do scAb ocupa  $1,6 \times 10^{-13} \text{ cm}^2$ . Nanopartículas de 15 nm de diâmetro com DO 1 apresentam uma área superficial de  $9,90 \text{ cm}^2$ . Sabendo que 1 scAb tem aproximadamente  $7,47 \times 10^{-20} \text{ g}$  e que a concentração inicial de scAbs é  $2,7 \text{ mg/mL}$ , 1 mL de solução contém  $3,61 \times 10^{16}$  scAbs, isto é,  $5776 \text{ cm}^2$  de área ocupada.

Sabendo que em 1 mL de Nps Au,

$$\frac{\text{área superficial Nps Au (15 nm)}}{\text{área superficial do scAb}} = 6,1875 \times 10^{13} \text{ scAbs}$$

e que a este número de scAbs correspondem  $4,63 \times 10^{-6} \text{ g}$ . Assim, para Nps Au de 15 nm de diâmetro a concentração teórica de scAbs necessária para cobrir toda a superfície é  $4,63 \mu\text{g/mL}$ .

Para Nps Au de 20 nm de diâmetro, 1 mL com DO 1 corresponde a  $8,80 \text{ cm}^2$  de área superficial. Sabendo que em 1 mL de Nps Au,

$$\frac{\text{área superficial Nps Au (20 nm)}}{\text{área superficial do scAb}} = 5,5 \times 10^{13} \text{ scAbs}$$

e que a este número de scAbs correspondem  $4,11 \times 10^{-6} \text{ g}$ . Assim, para Nps Au de 20 nm de diâmetro a concentração teórica de scAbs necessária para cobrir toda a superfície é  $4,11 \mu\text{g/mL}$ .

Para Nps Au de 40 nm de diâmetro, 1 mL com DO 1 corresponde a  $4,52 \text{ cm}^2$  de área superficial. Sabendo que em 1 mL de Nps Au,

$$\frac{\text{área superficial Nps Au (40 nm)}}{\text{área superficial do scAb}} = 2,83 \times 10^{13} \text{ scAbs}$$

e que a este número de scAbs correspondem  $2,12 \times 10^{-6} \text{ g}$ . Assim, para Nps Au de 40 nm de diâmetro a concentração teórica de scAbs necessária para cobrir toda a superfície é  $2,12 \mu\text{g/mL}$ .

## B - Especificações

Coeficiente de variação (CV),

$$CV = \frac{\sigma}{\bar{x}} \times 100$$

onde  $\sigma$  é o desvio padrão e  $\bar{x}$  é a média aritmética.

O bias é definido pela seguinte equação,

$$\text{bias} = \frac{\text{Valor de PCR recuperado} - \text{Valor PCR método de referência}}{\text{Valor PCR método de referência}} \times 100$$

O bias total é definido pela seguinte equação,

$$\text{Bias total} = \frac{\bar{x} \text{ valor PCR recuperado} - \bar{x} \text{ valor PCR método de referência}}{\bar{x} \text{ valor PCR método de referência}} \times 100$$

A imprecisão total (IT) é definida pela seguinte equação,

$$IT = \sqrt{\frac{\sum \left( \frac{\text{Valor PCR recuperado 1} - \text{Valor PCR recuperado 2}}{\bar{x}} \right)^2}{2 \times n}}$$

onde  $\bar{x}$  é a média aritmética do valor de PCR recuperado 1 e 2 e n o número total de duplicados de ensaios de PCR.

### C - Tabela resumo de critérios de aceitação e respectivos resultados da validação analítica

Parâmetro	Critério de aceitação	Resultados
Gama dinâmica	Gama dinâmica linear entre 4 e 180 mg/L	$Y=0.99x-1.02$ com $r^2=0.999$ entre 2.9 e 191 mg/L
Precisão	CV $\leq 10\%$ Repetibilidade (R) $\leq 10\%$	Amostra 1: PCR=7.8 mg/L CV=9.9% e R=7.4% Amostra 2: PCR=13.8 mg/L CV=8.9% e R=8.1% Amostra 3: PCR=27.4 mg/L CV=6.7% e R=3.5% Amostra 4: PCR=72.6 mg/L CV=6.2% e R=4.1% Amostra 5: PCR=95.6 mg/L CV=6.0% e R=4.1% Amostra 6: PCR=156.8 mg/L CV=6.6% e R=4.0%
Exatidão	Bias $\leq 2\%$ Relativo ao material de referencia certificado e CV $\leq 10\%$	Valor médio= 40.6 mg/L Bias= -1.5% CV= 6.6%
Imprecisão total	CV $\leq 10\%$	Gama baixa (4.1-22mg/L) CV=6.6%; BIAS=0.2% Gama média(22-60mg/L) CV=6.8%; BIAS=2.1% Gama alta(60-183.5mg/L) CV=6.3%; BIAS=0.6%
Equivalência	Regressão linear entre o método de referência e as recuperações do spinit® com coeficiente de correlação $r > 0.95$ ; bias $\leq 2\%$ e CV $\leq 10\%$	$Y=0.99x+1.26$ com $r=0.991$ entre 4.1 e 183.5 mg/L com CV=6.3% e Bias= 0.9%

**D - Variação de velocidades de entrada na zona de detecção na amostra a das Nps Au**

Velocidade Amostra (rpm)	Velocidade Nps Au (rpm)
1500	2000
1500	2300
1700	1700
1700	1900
1700	2000
1700	2200
1700	2300
1700	2900
2300	1700
2300	2300